Pharmakologische und immunhistochemische Untersuchungen an retinalen Nervenzellen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Thomas Voigt
aus Mülheim an der Ruhr

1986

PHARMAKOLOGISCHE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AN RETINALEN NERVENZELLEN

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard - Karls - Universität Tübingen

vorgelegt

von

THOMAS VOIGT

aus Mülheim an der Ruhr

1986

Tag der mündlichen Prüfung	:	30. Mai 1986
Dekan	:	Prof. Dr. R.Hampp
1. Berichterstatter	:	Prof. Dr. H. Wässle
2. Berichterstatter	:	Prof. Dr. H.-U. Schnitzler

für Ana

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543922_0031

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINFÜHRUNG 1

II. GLYCINERGE INHIBITION IN DER KATZENRETINA

II.1. EINLEITUNG 4
II.2. METHODE
-Elektrophysiologie 7
-Elektroden 7
-Ganglienzellklassifikation 7
-Optische Stimulierung und Datenauswertung 8
-Iontophorese in der Retina 8
II.3. ERGEBNISSE
-Wirkung von Glycin 10
-Wirkung von APB 13
II.4. DISKUSSION
-Die Interpretation der APB- und Strychninwirkung 19

III. ACETYLCHOLIN IN DER RATTENRETINA

III.1. EINLEITUNG 22
III.2. METHODE
-Immunhistochemie zum Nachweis von Acetylcholintransferase 24
-Intrazelluläre Injektion 25
-Optische Nervdegeneration 27
III.3. ERGEBNISSE
-Acetylcholintransferase positive Zellen in vertikalen Schnitten 28
-ChAT positive Zellen im Totalpräparat 30
-Mosaik der ChAT positiven Zellen 34
-Morphologie der ChAT positiven Zellen 36
-Das Dendriten-Netzwerk der ChAT positiven Zellen 38
-Durchtrennung des Optischen Nerven 39

-Intrazelluläre Injektion des Fluoreszensfarbstoffes Lucifer Yellow 39
-Dendritenbaumgröße 43
-Vergleich von ChAT positiven und Lucifer Yellow gefärbten Zellen 44
-Doppelfärbungsexperimente 45
-Analyse des Überdeckungsfaktors 49
-Dichte der cholinergen Innervation 50
III.4. DISKUSSION
-ChAT positive Zellen in der Rattenretina 51
-Intrazelluläre Injektion von Lucifer Yellow 52
-Vergleich zwischen Ganglienzelldichte und Dichte der cholinergen Zellen 53
-Vergleich zwischen cholinergem System von Ratte und Kaninchen 54

IV. DOPAMIN IN DER KATZEN- UND IN DER RATTENRETINA

IV.1. EINLEITUNG 58
IV.2. METHODE
-Immunhistochemie 60
-Fluoreszensinduzierte Färbung und intrazelluläre Injektion von Lucifer Yellow 60
-Umwandlung des Lucifer Yellows und Elektronmikroskopie .. 61
IV.3. ERGEBNISSE
-Tyrosinhydroxylase positive Zellen in der Katzenretina .. 63
-Tyrosinhydroxylase positive Zellen in der Rattenretina .. 65
-Aufbau und Struktur der Ringe 67
-Histofluoreszensfärbung und intrazellulär Injektion von Lucifer Yellow 67
-Tyrosinhydroxylasefärbung im Vertikalschnitt 73
-Identifizierung der in den Ringen liegenden Zellen 74
-Dopaminerge Zelldicht und Ringdichte 75
-Dopaminerge Innervation der AII Amakrinzelle 78

IV.4. DISKUSSION
-Tyrosinhydroxylase positive Zellen in der Vertebratenretina 84
-Vergleich zwischen dem dopaminergen System von Katze und Ratte 84
-Intrazelluläre Injektion von Zellkörpern nach induzierter Fluoreszenz..... 86
-Die dopaminergen Synapsen am Zellkörper der AII Amakrinzellen 87
-Mögliche Rolle der dopaminergen Innervation 88

V. LITERATURVERZEICHNIS 89

VI. DANKSAGUNG 99

VII. LEBENSLAUF 100

I. EINFÜHRUNG

Mit der Entdeckung der chemischen Übertragung zwischen Nerv und Muskel in den dreißiger Jahren durch Otto Loewi und Henry Dale, wurde die Schlüsselrolle der Transmitter in der Informationsverarbeitung des gesamten Nervensystems deutlich. Neben den klassischen Transmittersubstanzen des peripheren Nervensystems (Acetylcholin, Adrenalin und Noradrenalin) finden sich im zentralen Nervensystem eine Fülle von Substanzen, bei denen eine Transmitterfunktion nachgewiesen ist. Dale hat als erster posuliert, daß diese chemischen Stoffe auch in unterschiedlichen Zelltypen lokalisiert sind. Durch neuartige anatomische und physiologische Methoden wird es in immer mehr Fällen möglich den verschiedenen Zelltypen bestimmte Transmittersubstanzen zuzuschreiben.

Das Ziel unserer Arbeitsgruppe ist es, die Interaktionen von Nervenzellen in der Netzhaut des Auges physiologisch und anatomisch zu verstehen. An dieses Verständnis ist die Hoffnung geknüpft, Rückschlüsse über die Aufgabe eines Neuronentyps innerhalb des Zellverbandes zu erhalten. Die Vertebratenretina ist besonders gut für diese Fragestellungen geeignet. Ihr einziger Eingang sind die lichtempfindlichen Photorezeptoren und ihr einziger Ausgang sind die optischen Nervenfasern, die ins Gehirn projizieren. Diese gerichtete Organisation unterscheidet sie von allen anderen Strukturen des visuellen Systems, die oft in komplexer Weise untereinander und mit anderen Zentren des Gehirnes in Verbindung stehen. In physiologischen Experimenten kann die Retina durch den adäquaten Reiz stimuliert werden und die geordnete schichtenförmige Anordnung der Nervenzellen erleichtert die anatomische Analyse. Der neuronale Anteil der Netzhaut ist aus fünf großen Zellklassen aufgebaut. Die Photorezeptoren wandeln Lichtreize in elektrische Signale um, die sie an die Bipolarzellen weitergeben. Diese Information wird durch die lateral verschalteten Horizontalzellen in der äußeren plexiformen Schicht modifiziert. Die Bipolarzellen geben ihrerseits die Information in der inneren plexiformen Schicht an die, ins

Gehirn projizierenden Ganglienzellen weiter. Auf dieser Ebene sind die Amakrinzellen die lateral verschalteten Elemente.

Kuffler beschrieb zum ersten Mal bei den Säugetieren, daß es zwei große Gruppen von Ganglienzellen in der Retina gibt. Die eine Gruppe registriert helle Objekte auf dunklem Hintergrund (On-Zellen) und die andere Gruppe registriert dunkle Objekte auf hellem Hintergrund (Off-Zellen). Erst in den letzten zehn Jahren wurde offensichtlich, daß diese physiologisch nachweisbare On-Off-Dichotomie ein anatomisches Korrelat hat. Anhand der Schichtung der Dendritenverzweigung von Amakrinzellen und Ganglienzellen in der inneren plexiformen Schicht kann man ablesen, ob die betreffende Zelle zum On- oder Off-Kanal gehört, oder ob sie beide Eigenschaften besitzt (On-Off Zellen). Eine ähnliche anatomische Auftrennung zeichnet sich auch für das Stäbchen- und das Zapfensystem ab. Durch die Untersuchung solcher anatomischen und physiologischen Beziehungen beginnt man die Organisation der Retina zu verstehen. Die laterale Interaktion der verschiedenen Amakrinzellsysteme innerhalb der inneren plexiformen Schicht ist nicht nur an der Ausbildung der On- und Off-Systeme beteiligt, sondern auch an Prozessen wie Dunkel- und Helladaptation, Kontrast- und Kantensehen, oder Bewegungsdetektion.

Verschiedene Amakrinzelltypen können anhand ihrer Zellkörpergröße oder Zellkörperform nur in seltenen Fällen unterschieden werden. Erst durch die Darstellung der Zellgestalt und durch die Kenntnis der Transmittersubstanz lassen sich distinkte Zellsysteme unterscheiden. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Transmittersubstanzen Glycin, Acetylcholin und Dopamin in der Retina untersucht. Acetylcholin und Dopamin sind in Amakrinzellen lokalisiert, wogegen Glycin sich zusätzlich auch in bestimmten Bipolarzellen nachweisen läßt.

Der erste Teil behandelt den glycinergen inhibitorischen Einfluß dieser Bipolarzellen und Amakrinzellen auf Ganglionzellen in der Katzenretina. Durch die Verwendung der Iontophoresetechnik konnte elektrophysiologisch eine, aus anatomischen Befunden entwickelte

Hypothese bestätigt werden, nach der zwischen On- und Off- System reziproke Verschaltungen bestehen.

Der zweite Teil beschreibt die acetylcholinergen Amakrinzellen in der Rattenretina. Durch die Kombination von Immunhistochemie mit einer intrazellulären Fülltechnik war es möglich diesen Zelltyp im Detail zu charakterisieren.

Der dritte Teil analysiert das dopaminerge System bei der Katze und bei der Ratte. Mit Hilfe von Immunhistochemie, intrazellulärer Füllung und Elektronenmikroskopie konnte die Verschaltung dieses modulatorischen Systems auf ein glycinerges Interneuron des Stäbchensystems nachgewiesen werden.

Die Bedeutung dieser Befunde für das Verständnis der funktionellen Verknüpfungen im retinalen Netzwerk wird in den einzelnen Abschnitten diskutiert.

II. GLYCINERGE INHIBITION IN DER KATZENRETINA

II.1. EINLEITUNG

Transmittersubstanzen werden von den Zellen, die den entsprechenden Transmitter ausschütten, zur Wiederverwendung mit hoher Affinität aufgenommen. Bietet man den Zellen radioaktive Transmitter an, so lassen sich die Zellen markieren, die den entsprechenden Transmitter aufnehmen. Mit dieser Methode ließ sich Glycin in allen untersuchten Vertebratenretinae nachweisen (Ehinger und Falck,'71; Brunn und Ehinger,'72; Marshall und Voaden,'74; Marc und Lam,'81; Kleinschmidt und Yazulla, 84). In den meisten Arbeiten wird Glycin in Zellen lokalisiert, die mit ihrem Zellkörper in der inneren nukleären Schicht liegen (Berger et al.,'77). Aus diesem Grunde wurde vermutet, daß die Aufnahme von Glycin spezifisch für bestimmte Amakrinzellen sei. Neuerdings gibt es vermehrt Hinweise dafür, daß sowohl bei der Katze, als auch beim Menschen bestimmte Bipolarzellen Glycin aufnehmen (Pourcho,'80; McGuire et al.,'80, '84 a,b; Sterling,'83; Frederick et al.,'84; Marc und Liu,'85).

Kürzlich wurde von McGuire et al. ('84 a,b) auf Grund solcher antomischen Befunde ein Mechanismus postuliert ("push-pull Hypothese"), der die Zentrumsantwort einer Ganglienzelle durch das Zusammenspiel von erregenden und hemmenden Eingängen von Bipolarzellen erklärt (Abb.1A,B). On-Ganglienzellen erhalten einen erregenden Eingang von On-Bipolarzellen und einen hemmenden glycinergen Eingang von Off-Bipolarzellen. Off-Ganglienzellen erhalten einen erregenden Eingang von Off-Bipolarzellen und eine glycinerge Inhibition von On-Bipolarzellen. Abbildung 1C zeigt einen andern möglichen Weg für eine Verbindung zwischen On- und Off-Kanal; On-Bipolarzellen haben einen erregenden Eingang auf eine Amakrinzelle, die ihrerseits die Off-Ganglienzellen hemmt, indem sie Glycin als Transmitter verwendet. Ein ähnlicher Weg kann auch für Off-Bipolarzellen postuliert werden.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß Glycin eine starke inhibitorische Wirkung auf alle Ganglienzellen in der Katzenretina hat (Bolz et al.,'85b). Zwei-Amino-4-Posphonobuttersäure (APB) ist in der Retina der Kaltblüter (Necturus) ein spezifischer Blocker für die Lichtantwort der On-Bipolarzellen. Die Antwort der Off-Bipolarzellen wird von dieser Droge nicht beinflußt (Slaughter und Miller,'81,'85). Bei der Katze unterdrückt APB ebenfalls die Lichtantwort der On-Ganglienzellen. Im Gegensatz zum Necturus, wird aber die Lichtantwort der Off-Ganglienzellen erhöht (Bolz et al.,'84; Horton und Sherk,'84; Sherk und Horton,'84). In der Kaninchenretina wurden ähnliche Wirkungen von APB auf die Ganglienzellen beobachtet (Massey et al.,'83).

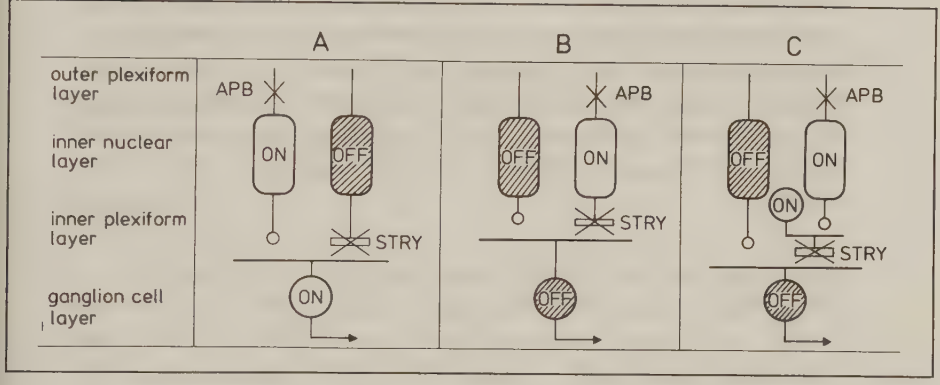

Abb.1 - Die Push-pull Hypothese erklärt die exzitatorische und inhibitorische Interaktion zwischen Bipolarzellen und Ganglienzellen in der Retina (McGuire et al.,'84a). A., zeigt eine On-Ganglienzelle, die einen exzitatorischen Eingang von depolarisierenden Bipolarzellen (On-Bipolarzellen) und einen zusätzlichen inhibitorischen Eingang von hyperpolarisierenden Bipolarzellen (Off-Bipolarzellen) erhält. B., zeigt eine Off-Ganglienzelle, die durch eine Off-Bipolarzelle erregt wird und durch eine On-Bipolarzelle gehemmt wird. C., in diesem Fall erhält die Off-Ganglienzelle keinen direkten inhibitorischen Eingang von einer On-Bipolarzelle, sondern wird durch eine zwischengeschaltete Amakrinzelle inhibiert. Ein analoger Weg kann auch für die On-Ganglienzelle postuliert werden. Applikation von APB würde spezifisch die On-Bipolarzelle blockieren (X). Applikation von Strychnin (STRY) würde spezifisch die glycinerge Inhibition zwischen Bipolarzelle und Ganglienzelle (X) oder zwischen Amakrinzelle und Ganglienzelle (X) blockieren.

Abbildungen 1B und 1C bieten eine mögliche Erklärung für dieses unerwartete Verhalten der Off-Ganglienzellen unter APB-Wirkung. Die Unterdrückung einer inhibitorischen On-Bipolarzelle durch APB könnte, infolge der Desinhibition, die Feuerfrequenz der Off-Ganglienzelle erhöhen. Falls dieser inhibitorische Einfluß auf die Off-Ganglienzelle durch glycinerge Bipolarzellen (Abb.1B), oder durch zwischengeschaltete glycinerge Amakrinzellen gemacht wird, so sollte Strychnin, das ein potenter Antagonist zu Glycin ist (Bolz et al.,'85b), diesen Einfluß blockieren. Aus diesem Grund sollte die Applikation von APB in der Gegenwart von Strychnin keinen Einfluß mehr auf die Off-Ganglienzellentladung haben.

Im ersten Teil der Arbeit wurde mit Hilfe von mehrkanaligen Elektroden, extrazellulär von Ganglienzellen in der Katzenretina abgeleitet. Die Wirkung von iontophoretisch appliziertem APB auf Off-Ganglienzellen und dessen Interaktion mit gleichzeitig angebotenem Strychnin wurde im Detail untersucht. Es war das Ziel, die anatomische Hypothese des inhibitorischen On-Bipolarzelleinflusses auf Off-Ganglionzellen elektrophysiologisch zu untersuchen (Abb.1B,C).

II.2. METHODE

Elektrophysiologie

Vier erwachsene Katzen (2,2-4,0 kg) wurden mit Halothan (2-4%) in einer Mischung von Stickstoffoxid und Carbogen (2:1) narkotisiert. Nach der Operation wurde dem Stickstoffoxid intravenös Pentobarbiturat (1mg/kg/h) zugesetzt. Halothan wurde dann abgesetzt. Die Narkosetiefe wurde durch EEG-Aufzeichnung kontrolliert. Die Tiere waren paralysiert und wurden künstlich beatmet. Die Körpertemperatur wurde auf 38,0°C gehalten.

Die Katze wurde in einen stereotaktischen Kopfhalter eingespannt und das linke Auge wurde am Limbus an einen Ring genäht. Die Ableitelektrode wurde über eine Stahlkanüle von 2mm Durchmesser in den Glaskörper eingeführt und auf der Retina positioniert. Für eine detaillierte Beschreibung dieser Technik siehe Peichl und Wässle ('79) oder Bolz et al.('85b).

Elektroden

Wolfram-in-Glas Mikroelektroden wurden aus siebenkanaligen Glasrohlingen (äußerer Durchmesser 1,2mm) hergestellt (Levick,'72; Bolz et al.'84). Die Mikroelektroden wurden auf einem Elektrodenziehgerät (David Kopf) gezogen. Ihre Spitzen wurden auf 4-5µm abgebrochen. Ein elektrolytisch angespitzter Wolframdraht wurde durch den zentralen Kanal geschoben bis er 12-15µm aus der Glasspitze herausragte. Dieser Draht wurde am oberen Elektrodenende mit DeKhotinsky's Zement am Glas verklebt. Die umliegenden Kanäle wurden mit einer Hamiltonspritze mit Drogen gefüllt. Der elektrische Kontakt wurde mit Platium-Iridium-Drähten hergestellt, die ebenfalls mit DeKhotinsky's Zement verklebt wurden.

Ganglienzellklassifikation

Die meisten abgeleiteten Ganglienzellen haben ein rundes rezeptives Feld und gehören entweder dem tonischen X-Typ oder dem

phasischen Y-Typ an. Zellen anderer Typen wurden gelegentlich abgeleitet, aber nicht weiter ausgewertet. Mit verschiedenen optischen Tests (Antwort auf stehenden Kontrast, Peripherie-Effekt, Empfindlichkeit für Größe, Form und Geschwindigkeit eines Reizes)(Cleland und Levick,'74a,b) lassen sich Ganglienzellen mit runden rezeptiven Feldern eindeutig charakterisieren. Bei gleicher retinaler Exzentrizität haben Y-Zellen ein dreifach größeres rezeptives Feld als X-Zellen (Peichl und Wässle,'79).

Optische Stimulierung und Datenauswertung

Zentrumsantworten wurden durch Lichtpunkte in der Größe des gemessenen rezeptiven Feldes ausgelöst. Die Reizung des rezeptiven Umfeldes erfolgte durch Lichtringe. Ihr innerer Durchmesser entsprach dem rezeptiven Feldszentrum der Zelle; ihr äußerer Durchmesser betrug 20°. Die Reizstärke war 0,1-25 cd/m² auf einem homogenen Hintergrund von 2-100cd/m². Einige Off-Zellen wurden mit einen schwarzen Punkt auf hellem Hintergrund gereizt. Die Länge des Lichtreizes betrug 512msec "Licht an" und 512msec "Licht aus". Antworten auf 16 oder 32 Präsentationen des Reizes wurden auf dem Computer als Reiz-Antworthistogramm mit einer Binweite von 15msec gemittelt. Die intergrierte Aktivität über einen Reizzyklus (1024msec) wurde kontinuierlich aufgezeichnet.

Iontophorese in der Retina

Alle Drogen wurden mit Hilfe einer Neurophore BH-2 Stromquelle injiziert. Der Widerstand, der mit Drogen gefüllten Kanäle lag je nach Substanz und Elektrodenspitze zwischen 20-60 MegOhm. Die Haltetröme betrugen zwischen 0-40nA, die Injektionsstromstärken bis 50nA. APB (2-amino-4-phosphonobutyrate, Calbiochem) wurde als 0,1M Lösung angesetzt, und mit NaOH auf pH7 titriert. Alle anderen Substanzen wurden in pysiologischer Kochsalzlösung (165mM NaCl) angesetzt und mit HCl titriert. Die Substanzen waren: N-Methylbicucullinbromid (Cambidge Research Biochemical), 0,5mM bei pH3; Strychnin (Serva), 2,5mM bei pH3; und Glycin (Sigma) 0,1M bei pH3.

Die Position der Elektroden im Auge konnte auf den Protokollschirm mit Hilfe einer Funduskamera (Zeiss) zurückgespiegelt werden. Wenn sich die Elektrodenposition innerhalb des gemessenen rezeptiven Feldes befand, so wurde daraus geschlossen, daß vom Zellkörper bzw. Dendriten abgeleitet wurde (Peichl und Wässle,'83). Axonableitungen, bei denen die Elektrode außerhalb des rezeptiven Feldzentrums lag, wurden verworfen, da die applizierten Drogen in diesen Fällen, die synaptischen Stellen an Zellkörper und Dendriten nicht erreichen. Die meisten Ableitungen wurden in dem Raphebereich der temporalen Retina gemacht, wo es keine Axonbündel gibt. Die Interaktion von APB, Glycin und Strychnin wurden an 32 Ganglienzellen detailliert untersucht (14 On-Zellen, 18 Off-Zellen).

II.3. ERGEBNISSE

Die Wirkung von Glycin

Iontophoretisch appliziertes Glycin und dessen Antagonist Strychnin beinflussen die Aktivität aller Ganglionzellen in der Katzenretina (Bolz er al.'85b). Die typische Wirkung dieser Substanzen ist in Abbildung 2 für eine X-Zelle gezeigt, bei der die neuronale Aktivität durch einen mesopischen Reiz des rezeptiven Feldes hervorgerufen wurde. Die Zahlenwerte neben der mittleren Entladungsrate markieren den Zeitpunkt, an welchem die mit entsprechenden Nummern versehenen Histogramme registriert wurden. Die mittlere neuronale Aktivität liegt bei etwa 50Hz. Das Reiz-Antworthistogramm (Histogramm 1) ist typisch für eine X-Zelle die auf "Licht aus" reagiert (Off-X). Reduziert man den Haltestrom beim Glycin Kanal von -40nA auf 0nA, so wird die Aktivität der Zelle völlig unterdrückt (Histogramm 2). Die Inhibition durch das extern applizierte Glycin hört mit dem erneuten Anlegen des Haltestromes sofort wieder auf. Im Gegensatz dazu hat die Applikation von +5nA Strychnine eine enorme Steigerung der Ativität zur Folge (Histogramm 3). Injiziert man Glycin während der Strychninapplikation, so zeigen weder die kontinuierliche Aufzeichnung noch die Histogramme eine glycininduzierte Inhibition (Vergleiche Histogramme 3 und 4). Nach Beendigung der Strychningabe kehrt die Feuerrate der Zelle langsam wieder auf das Ursprungsniveau zurück. Glycin kann dann wieder seine inhibitorische Wirkung entfalten.

Die Erhöhung der Feuerrate während der Strychninapplikation kann nicht die Blockierung der Glycinwirkung erklären. Die Abbildung 3 zeigt den Einfluß von periodisch appliziertem Glycin auf eine On-Y und auf eine Off-X Zelle (Zykluslänge der gepulsten Glycininjektion = 25 Sekunden). Ein Vergleich von A mit B und von C mit D zeigt, daß Bicucullin und Strychnin die Aktivität um etwa den gleichen Betrag erhöhen. Trotz der gleichen Erhöhung in der Aktivität, wird extern angebotenes Glycin von dem GABA Antagonisten Bicucullin nicht beeinflußt, von Strychnin aber vollständig blockiert.

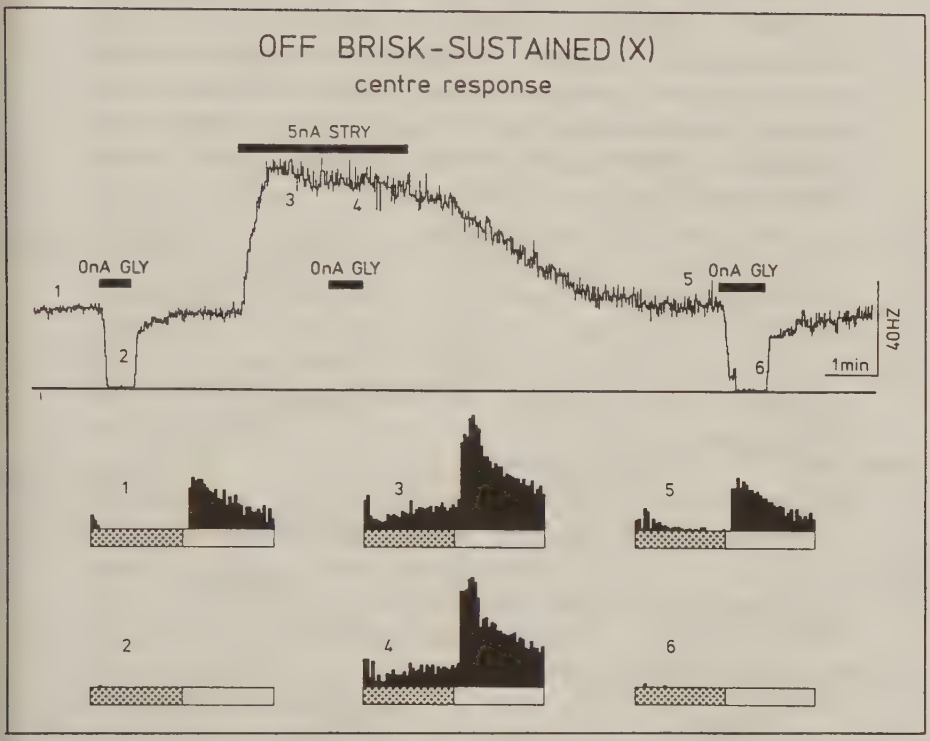

Abb.2 - Der Effekt von Glycin (Gly) und Strychnin (STRY) auf die Aktivität einer Off-Ganglienzelle während eines Lichtreizes. Die kontinuierliche Aufzeichnung zeigt die Anzahl der Aktionspotentiale, gezählt in den 1024msec Intervallen. Die untere horizontale Linie ist die Null-Linie. Die schwarzen horizontalen Balken sind die Intervalle der Drogenapplikation. Die Stärke des Iontophoresestromes und die applizierten Drogen sind eingezeichnet. Der Haltestrom betrug -40nA für Glycin und -15nA für Strychnin. Diese Zelle hatte eine Exzentrizität von 8°. Das rezeptive Feldzentrum wurde mit einem Punkt (40° Durchmesser) von 25cd/m² gegen einen Hintergrund von 3cd/m² gemessen. Die Reiz-Antworthistogramme von 32 Reizen wurden zu den Zeiten registriert, die in der kontinuierlichen Aufzeichnung mit Nummern markiert sind. Die punktierten Balken unter den Histogrammen markieren die 512msec der Licht-an-Periode; die offenen Balken markieren die 512msec der Licht-aus-Periode. Die Höhe des Lichtbalkens entspricht 40 Aktionspotentialen pro Sekunde.

Zusammengefaßt kann man sagen, daß extern angebotenes Glycin eine starke inhibitorische Wirkung auf alle X-Zellen und Y-Zellen hat. Diese Wirkung kann durch den Antagonisten Strychnin vollständig blockiert werden. Bicucullin, das ein starker Antagonist für die GABAerge Inhibition ist, kann die Wirkung von Glycin nicht blockieren. Umgekehrt kann Strychnin nicht die GABAerge Wirkung beeinflussen (Bolz et al.,'85 b)

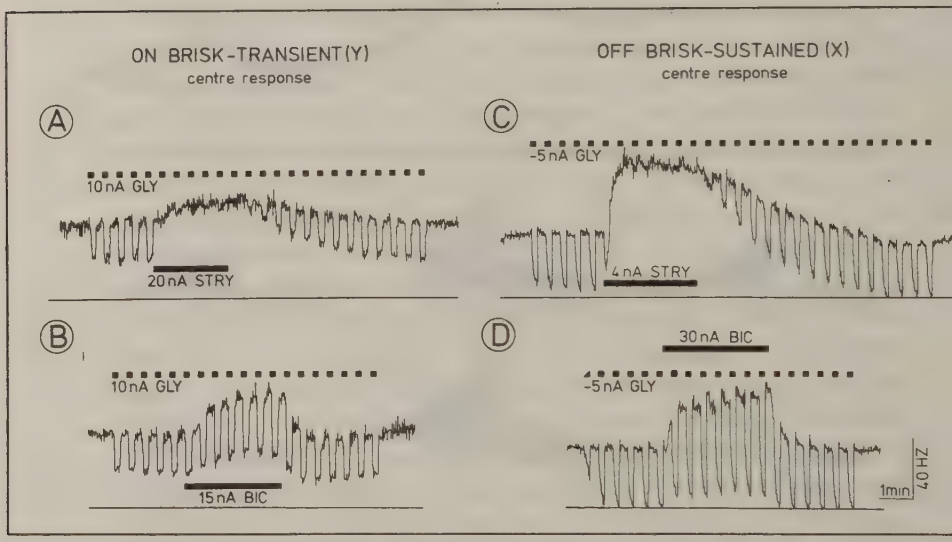

Abb.3 - Der Einfluß von Glycin (GLY), Strychnin (STRY) und Bicucullin (BIC) auf die Entladungsraten von zwei Ganglienzellen während der Lichtreizung. Die linken Aufzeichnungen (A und B) sind von einer On-Y-Zelle. Die rechten Aufzeichnungen (C und D) sind von einer Off-X-Zelle. Die Zahl der Aktionspotentiale, gemessen in 1024msec Intervallen, ist als kontinuierliche Aufzeichnung eingetragen: die Grundlinie stellt die Null-Linie dar. Die kurzen Balken geben an, wann Glycin periodisch für jeweils 10 Sekunden appliziert wurde. Die Zeiträume, während denen Strychnin (in A und C) und Bicucullin injiziert wurden (in B und D), sind durch lange Balken eingezeichnet. Die rezeptiven Feldzentren beider Zellen wurden mit einem Lichtpunkt von 1,7° Durchmesser und 5 cd/m² (linke Aufzeichnung) bzw. 40' Durchmesser und 25 cd/m² (rechte Aufzeichnung) gegen einen Hintergrund von 3 cd/m² gereizt. Der Haltestrom für Glycine war im rechten Fall -40nA und für die anderen Fälle -10nA.

Die Wirkung von APB

Iontophoretisch appliziertes APB unterdrückt die Aktivität von ON-Ganglienzellen und erhöht die Aktivität von Off-Ganglienzellen (Bolz et al.,'84). Die charakteristische biphasische Wirkung von APB wird in einer kontinuierlichen Aufzeichnung der Spontanaktivität in Abbildung 4 gezeigt. In der On-Zelle bewirkt APB innerhalb weniger Sekunden eine starke Unterdrückung der Feuerrate. Nach Beendigung der APB Injektion, tritt ein bemerkenswertes Überschießen in der Zellentladung auf. Die Zelle kehrt dann graduell zu ihrer ursprünglichen Entladungsfrequenz zurück. Die Antwort der Off-Zelle zeigt das inverse Verhalten. APB erhöht die Feuerfrequenz der Zelle und bewirkt beim Abschalten der Droge eine kurze Senkung der Aktivität.

Abbildung 5 zeigt die Wechselwirkung von APB mit Strychnin und Bicucullin bei einer On-X-Zelle. Die Zelle wurde periodisch mit einem Lichtpunkt im rezeptiven Feldzentrum gereizt (512 msec an, 512 msec aus). Wie man aus den kontinuierlichen Aufzeichnungen und den Histogrammen (1 und 2) sehen kann, unterdrückt APB die Lichtantwort. Weder Strychnin noch Bicucullin können die Wirkung von APB blockieren (Histogramme 5,6).

Das gleiche Experiment mit einer Off-X-Zelle zeigt einen bemerkenswerten Unterschied (Abb.6). Injektion von APB erhöht die Feuerrate dieser Zelle. Die Applikation von Strychnin wirkt ebenfalls erregend, blockiert aber zusätzlich die Wirkung des gleichzeitig injizierten APBs.

Die spezifische Blockade der APB-Wirkung bei Off-Neuronen durch den Glycinantagonisten Strychnin ist in Abbildung 7 nochmals genauer dargestellt. APB wurde bei einer On-Zelle (Abb.7A) und bei einer Off-Zelle (Abb.7B) periodisch appliziert (Injektion 15 sec, Pause 10sec). Die Aktivität der On-Zelle (Abb.7A) wird durch die APB Injektion unterdrückt. Dieser Unterdrückung folgt ein Anstieg in der Feuerrate, wenn die APB-Applikation beendet wird (Vergleiche Abb.4) Als Folge der rhythmischen Applikation ist eine periodischer Abfall

und Anstieg im Vergleich zur Ausgangsaktivität zu beobachten. Während der Injektion von Strychnin erhöht sich die mittlere Entladungsrate. Die periodischen Oszillationen bleiben aber bestehen. Die Feuerrate der Off-Zelle (Abb.7B) wird durch die Injektion von APB unterdrückt und schießt beim Absetzen von APB über. Ein periodischer Anstieg und Abfall im Bezug auf die Ausgangsaktivität ist die Folge. Wird Strychnin injiziert so ist die biphasische Modulation der Zellaktivität vollständig blockiert. Nach Beendigung der Strychnin-Applikation wird APB langsam wieder wirksam.

Man könnte argumentieren, daß Strychnin die Feuerrate der Zelle bis zur Sättigung erhöht, und deshalb kann APB keine zusätzliche Aktivitätssteigerung mehr bewirken. Dieses Problem wurde an einer Off-Y-Zelle untersucht (Abb.7C,7D). APB wurde periodisch appliziert

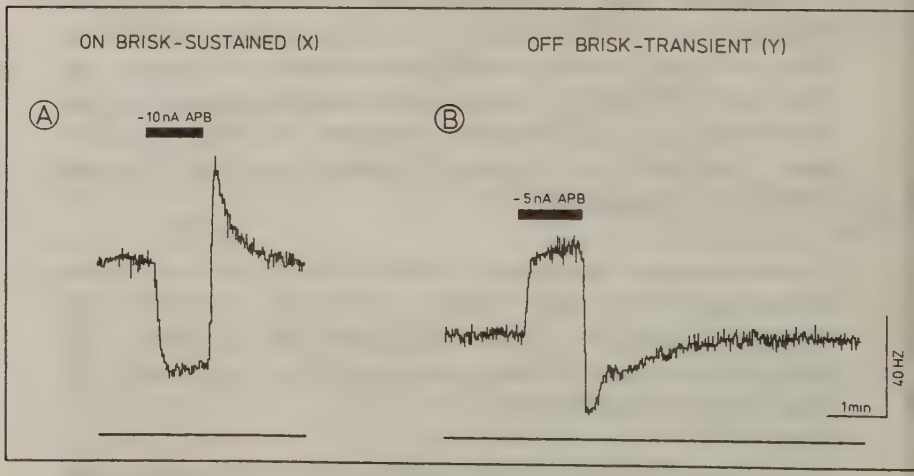

Abb.4 - Der Einfluß von 2-Amino-4-phosphonobuttersäure (APB) auf die Entladungsrate eine On-X-Zelle in A und einer Off-Y-Zelle in B. Die Zelle in A hatte ein rezeptives Feldzentrum mit einem Durchmesser von 1°. Es wurde mit einem Lichtpunkt von 40' und einer Intensität von 30 cd/m² auf einem Hintergrund von 3cd/m² gereizt. Die Zelle in B hatte ein rezeptives Feldzentrum von 3°. Die Reizgröße betrug 2,5° (Helligkeit 3 cd/m², Hintergrund 1 cd/m²). Beide Zellen lagen bei einer Exzentrizität von 10°. Die Haltetröme betrugen 10nA (A) und 8 nA (B).

und entweder Strychnin (Abb.7C) oder Bicucullin (Abb.7D) von zwei anderen Kanälen zugegeben. Während beide Drogen die Zellaktivität um etwa den gleichen Betrag erhöhen, blockiert nur Strychnin die APB-Modulation.

Eine weitere Erklärung für den beobachteten Effekt wäre, daß die Wirkung von APB auf Off-Zellen durch eine generelle Blockade des glycinergen Inhibitionsmechanismus wirkt und deshalb zu einer Erhöhung in der Feuerrate führt. Wäre das der Fall, so würde es sich bei der Blockade der APB Wirkung durch Strychnin um einen

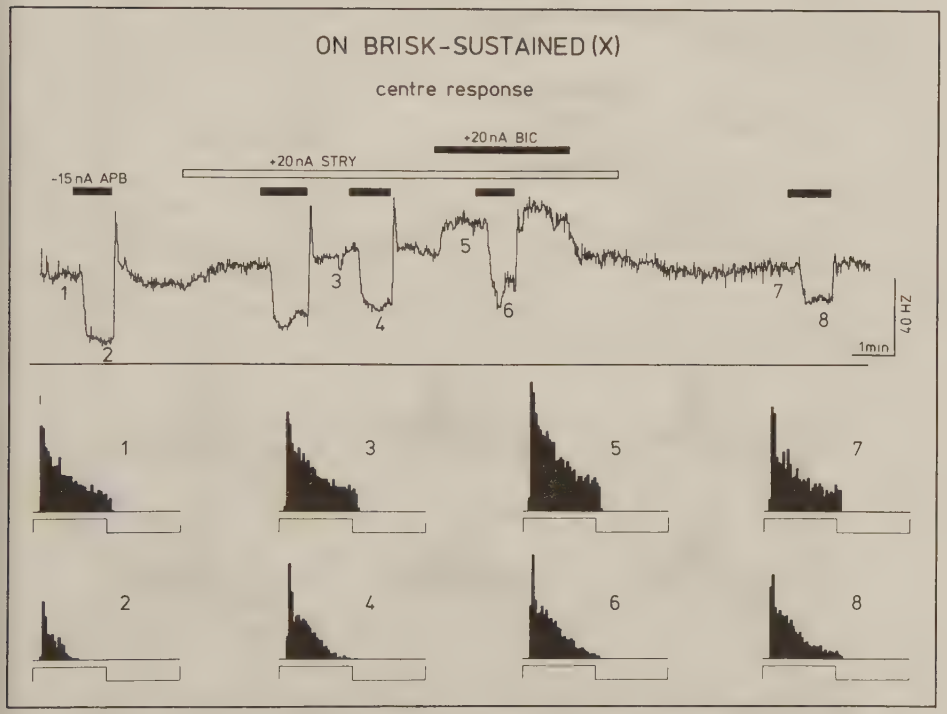

Abb.5 - Der Einfluß von APB, Strychnin (STRY) und Bicucullin (BIC) auf die Entladungsrate einer On-X-Zelle. Alle drei Drogen erhielten Halteströme von 10nA. Die Zellen wurden mit einem Lichtreiz von 9 cd/m² auf einem Hintergrund von 3 cd/m² gereizt. Der Durchmesser des Lichtpunktes betrug 40'. Das rezeptive Feldzentrum hatte einen Durchmesser von 50', die Exzentrizität der Zelle war 4°.

Konkurrenzeffekt der beiden Drogen am Glycinrezeptor handeln. Wenn alle Glycinrezeptoren durch Strychnin besetzt wären, so könnte APB keine Wirkung mehr auslösen. Diese mögliche Interpretation der Daten wird in Abbildung 8 widerlegt. Die Applikation von Glycin unterdrückt fast vollständig die Entladungsrate der Zelle (vergleiche Histogramme 1 und 2). Die Injektion von APB erhöht drastisch die Feuerrate ohne die glycinerge Inhibition zu blockieren (vergleiche Histogramme 3 und 4).

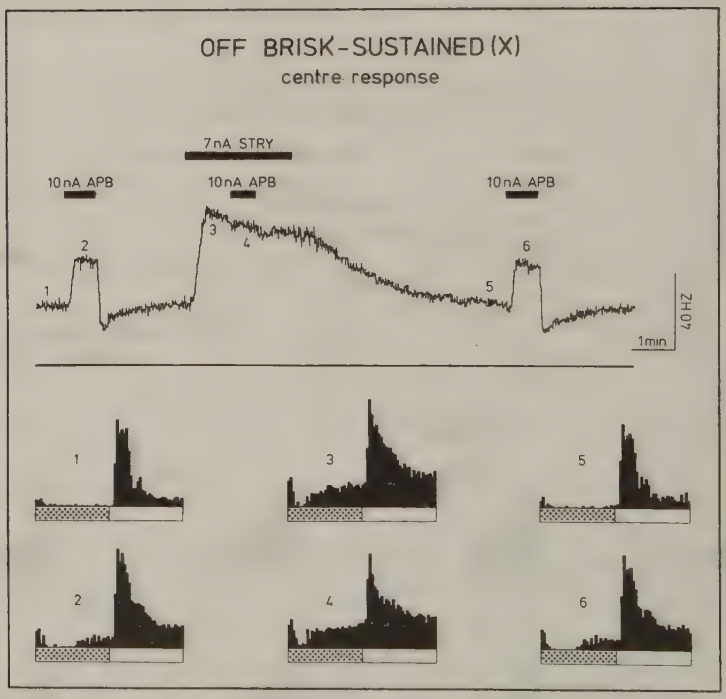

Abb.6 - Der Einfluß von APB und Strychnin (STRY) auf die Entladungsrate von Off-X-Zellen. Die Zellen wurden mit Lichtpunkten von 1° Durchmesser gereizt. Die Reizleuchtdichte betrug 3cd/m² auf einem Hintergrund von 1,5cd/m². Der rezeptive Felddurchmesser war 1,2° bei einer Exzentrizität von 9°. Für Strychnin war kein Haltestrom nötig, APB erhielt einen Haltestrom von 10nA. Bemerkenswert ist, daß Strychnin die APB-Wirkung völlig unterdrückt.

Zusammenfassend kann man sagen, daß iontophoretisch appliziertes APB die Feuerrate von On-Zellen senkt und von Off-Zellen erhöht. Die Wirkung von APB auf On-Zellen kann weder durch Strychnin noch durch Bicucullin blockiert werden. Die Wirkung von APB auf Off-Zellen kann vollständig durch Strychnin aufgehoben werden, nicht aber durch Bicucullin.

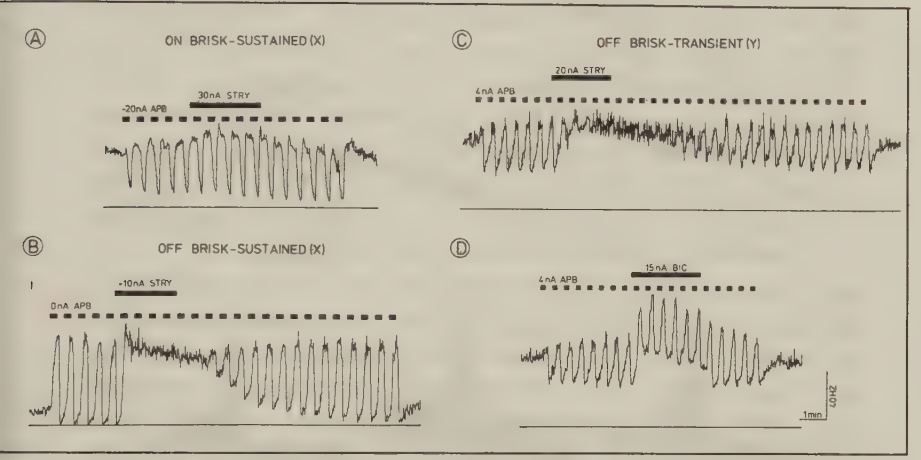

Abb.7 - Periodische Applikation von APB und seine Interaktion mit Strychnin und Bicucullin. Die Aufzeichnung in A ist von der gleichen On-Zelle wie in Abbildung 5, wo die speziellen Angaben gemacht werden. Die Aufzeichnung in B ist von einer Off-X-Zelle während Spontanaktivität (rezeptiver Felddurchmesser: 50'; Exzentrizität: 4°; Hintergrund: 3cd/m²). APB wurde von 9nA Haltestrom auf 0nA umgeschaltet. Die Aufzeichnungen in C und D sind von einer Off-Y-Zelle während Zentrumsreizung (Lichtpunkt: 2°, Reizhelligkeit: 30cd/m²; Hintergrund: 3cd/m²). Der rezeptive Felddurchmesser betrug 2,5° bei einer Exzentrizität von 6°. APB wurde periodisch von +9nA Haltestrom auf -4nA Injektionsstrom geschaltet (10sec Injektion, 15sec Pause). Bicucullin und Strychnin hatten Halteströme von 10nA. Interessant ist, daß Strychnin (in C) und Bicucullin (in D) die Aktivität der Zelle erhöhen, aber nur Strychnin die APB Aktivität blockiert.

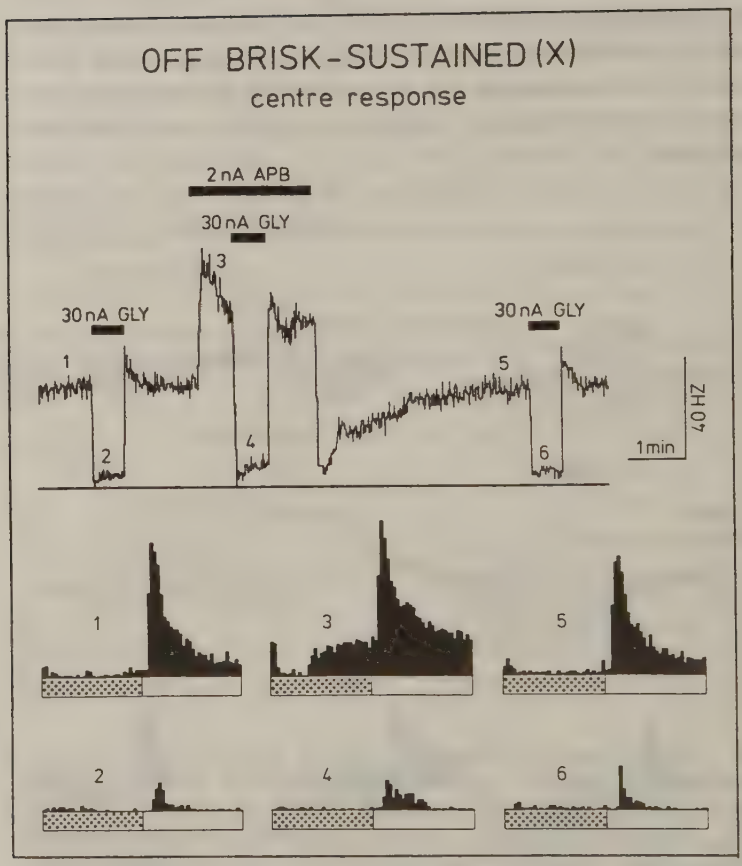

Abb.8 - Der Einfluß von Glycin (GLY) und APB auf die Entladungsrate einer Off-X-Zelle während Lichtreizung. APB und Glycin erhielten einen Haltestrom von 13nA. Reizdurchmesser: 1°, Reizhelligkeit: 3cd/m², Hintergrund: 2cd/m². Der Durchmesser des rezeptiven Feldes betrug 1,5° bei 11° Exzentrizität.

II.4. DISKUSSION

Interpretation der APB- und Strychninwirkung

In der Necturusretina und in der Kaninchenretina ist APB ein spezifischer Blocker für die On-Bipolarzellen (depolarisierende Bipolarzellen)(Slaughter und Miller,'81,'85; Bloomfield und Dowling,'85a,b). In einer früheren Veröffentlichung (Bolz et al.,'84) und auch in der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß APB in der Katzenretina nicht nur die On-Zellantwort unterdrückt, sondern zusätzlich die Off-Zellantwort erhöht. Wenn man in Analogie zur Necturusretina und zur Kaninchenretina annimmt, daß APB spezifisch die On-Bipolarzellantwort in der Katzenretina blockiert, wie ist dann der Effekt auf die Off-Bipolarzellen zu erklären?

McGuire et al. ('84 a,b) und Sterling ('83) lieferten durch eine elektronenmikroskopische Arbeit Evidenz dafür, daß Bipolarzellen radioaktiv markiertes Glycin aufnehmen. Mit der daraus abgeleiteten Vermutung, daß diese Bipolarzellen inhibitorisch auf die Ganglionzellen geschaltet sind, formulierten sie die "Push-pull Hypothese" (Fig.1A,B). Nach dieser Hypothese bekommen On-Ganglienzellen sowohl einen erregenden Eingang von On-Bipolarzellen, wie auch einen hemmenden Eingang von Off-Bipolarzellen. Umgekehrt erhalten die Off-Ganglienzellen einen erregenden Eingang von Off-Bipolarzellen und einen hemmenden Eingang von On-Bipolarzellen.

Eine solche Verschaltung könnte das Antwortverhalten der Ganglienzelle auf Licht verschärfen. Die Hypothese geht nicht davon aus, daß die gleiche On- (oder Off-) Bipolarzelle einen erregenden und einen inhibierenden Transmitter enthält. Sie fordert eine Klasse von On-Bipolarzellen die On-Ganglienzellen erregt und eine zweite Klasse von On-Bipolarzellen die Off-Ganglienzellen inhibiert. Eine alternative Verschaltung für Off-Ganglienzellen ist in Abb.1C gezeigt. In diesem Fall hat die On-Bipolarzelle einen erregenden Eingang auf eine Amakrinzelle, die dann die Off-Ganglionzelle hemmt.

Nach der "push-pull" Hypothese (Abb.1) würde die Unterdrückung der On-Bipolarzellen durch APB den erregenden Eingang auf die On-Ganglienzelle vermindern. Als Folge würde die Feuerrate reduziert. Die Blockierung der On-Bipolarzellen durch APB würde auch deren inhibitorischen Einfluß auf Off-Ganglienzellen reduzieren und so deren Entladungsrate erhöhen. Diese Annahme gilt sowohl für die direkte Inhibition (Abb.1B), als auch für die indirekte Inhibition über eine zwischengeschaltete Amakrinzelle (Abb.1C). Diese Hypothese ist in gutem Einklang mit den oben beschriebenen Ergebnissen. Darüberhinaus müßte man noch fordern, daß die On- und die Off-Ganglienzelle gleichermaßen den Zeitverlauf der APB-Wirkung auf On-Bipolarzellen widerspiegeln. Wegen der Zeichenumkehr, müßte der Zeitverlauf beider Antworten allerdings spiegelbildlich sein. Abbildung 4 zeigt, daß das der Fall ist. Beide Ganglienzelltypen (die On- und die Off-Ganglienzelle) zeigen eine biphasische Antwort auf APB, mit genau umgekehrter Polarität.

Was könnte der Transmitter sein, der von dem On-System benutzt wird, um das Off-System zu hemmen? Die Aufnahme von Glycin durch 10-12% der Bipolarzellen und 45% der Amakrinzellen (Wässle et al.,'86) läßt vermuten, daß diese Aminosäure für die Hemmung verantwortlich ist. In dem Ergebnisteil wurde gezeigt, daß die Ganglienzellantwort durch exogenes Glycin inhibiert wird. Diese Wirkung kann durch Strychnin vollständig unterdrückt werden (Abb.2,3). Applikation von Strychnin in Abwesenheit von Glycin erhöht die Feuerrate aller Ganglienzellen. Dies legt den Schluß nahe, daß die Ganglienzellen, unter einer ständigen endogenen glycinergen Inhibition stehen. Das entscheidende Experiment ist die Interaktion zwischen APB und Strychnin. Wenn der On-Kanal wirklich die Off-Ganglienzellen mit Hilfe der Transmittersubstanz Glycin hemmt, so muß Strychnin fähig sein, diesen Weg zu blockieren. Die Modulation der On-Bipolarzelle durch APB sollte folglich keinen Effekt mehr auf die Off-Ganglienzelle haben. Dieses wurde im Ergebnisteil dieser Arbeit gezeigt: beides, der Anstieg und der Abfall der Off-Ganglienzellantwort wird während der zyklischen Applikation von APB durch den Glycinantagonisten Strychnin blockiert (Abb.6,7).

Diese Ergebnisse machen es wahrscheinlich, daß in der Katzenretina, wie in der Necturusretina und in der Kaninchenretina, APB spezifisch auf On-Bipolarzellen wirkt. ON-Bipolarzellen erregen On-Ganglienzellen und haben einen inhibitorischen Einfluß auf Off-Ganglienzellen. Diese Befunde sind im Einklang mit einer direkten glycinergen Inhibition von einer On-Bipolarzelle auf eine Off-Ganglienzelle (Fig.1B) und ebenso mit einer indirekten Inhibition, bei der eine glycinerge Amakrinzelle zwischengeschaltet ist (Abb.1C).

III. ACETYLCHOLIN IN DER RATTENRETINA

III.1. EINLEITUNG

Einer der vielen Transmitter, die in Amakrinzellen der Vertebratenretina gefunden wurden, ist Acetylcholin. Erstmals wurde dieser aus dem peripheren Nervensystem bekannte Neurotransmitter in der Kaninchenretina mit Hilfe von autoradiographischen Methoden nachgewiesen (Masland und Mills,'79). Heute sind die cholinergen Zellen in der Kaninchenretina die am besten untersuchten Amakrinzellen überhaupt. Kürzlich gelang es, diesen Transmitter einer morphologisch sehr charakteristischen Amakrinzellpopulation zuzuschreiben (Tauchi und Masland,'84, Masland et al.,'84b), die schon früher in Golgi-Präparaten beschrieben worden war ("starburst cells" von Famiglietti,'83). Die spezielle Form ihres kappenförmigen Zellkerns in Nissl gefärbten Retinae und ihre Eigenschaft mit reduzierten Silberfärbemethoden dargestellt zu werden, ermöglichte die quantitative Analyse der gesamten cholinergen Zellpopulation in Totalpräparaten der Kaninchenretina (Hughes und Vaney,'80, Vaney et al.,'81). Der überraschende Befund dieser Arbeiten war, daß die cholinergen Zellen aus zwei Teilpopulationen bestehen. Die eine Gruppe hat die Zellkörper in der Ganglienzellschicht (GCL) und ihre Dendritenbäume verzweigen sich im inneren Teil der inneren plexiformen Schicht (IPL). Die zweite Population hat den Zellkörper in der inneren nukleären Schicht liegen, wo Amakrinzellen normalerweise zu finden sind und die Dendriten verzweigen sich im äußeren Teil der inneren plexiformen Schicht.

In allen untersuchten Säugetierspezies, inklusive Ratte (Eckenstein et al.,'81; Puro et al.,'82; Kondo et al.,'85; Ross et al.,'85) und Katze (Osman und Pourcho,'85; Schmidt et al.,'85), wurde Acetylcholin gefunden. In diesem Teil der Arbeit wird das cholinerge System bei pigmentierten Ratten und Albinoratten im Detail untersucht. Durch die Anwendung von monoklonalen Antikörpern gegen Acetylcholintransferase (ChAT) (Eckenstein et al., '81,'82) und durch intrazelluläre Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes

Lucifer Yellow (LY), war es möglich, eine bestimmte Amakrinzellklasse als cholinerg zu identifizieren. Eine quantitative Analyse der cholinergen Zellen zeigt sehr viel Ähnlichkeit zwischen dem cholinergen Zellsystem der Ratte und des Kaninchens.

III.2. METHODE

Immunhistochemie zum Nachweis von Acetylcholintransferase

Pigmentierte und Albinoratten (200-300g) wurden durch eine intraperitoneale Injektion einer 4% Chloralhydratlösung (1ml/100g Körpergewicht) tief narkotisiert. Die Perfusion wurde durch eine kurze Spülung mit 0,9% Saline eingeleitet, auf die dann eine zweistufige Fixation folgte. Das erste Fixativ enthielt 4% Paraformaldehyde, 0,1% Glutaraldehyde und 15% gesättigte Pikrinsäure in 0,1M Phosphatpuffer (PB, pH 7,4). Das zweite Fixativ enthielt 4% Paraformaldehyde in PB und wurde mit 0,1M Borsäure und 1N NaOH auf pH 9,75 titriert.

Die Augen wurden enukleiert und die vordere Augenkammer zusammen mit dem Glaskörper entfernt. Der Augenbecher wurde oben durch einen kleinen Einschnitt markiert und die Retina wurde vorsichtig vom Pigmentepithel abgeschält. Anschließend wurde die Retina für 3-8 Tage in 0,1M Phosphatpuffer (4° C) gewaschen, um freies Fixativ zu entfernen. Nach dieser Waschperiode ließ man das Gewebe in 30% Sucrose zu Boden sinken, um es dann in flüssigem Stickstoff bei -70°C schnell einzufrieren. Dieser Gefrierschock erleichterte das Eindringen der Antikörper (Leranth and Feher,'83). Zwischen sämtlichen Inkubationsschritten wurde das Gewebe für 30 Minuten in PB gewaschen, um die vorhergehenden ungebundenen Antikörper zu entfernen. Mit dem ersten monoclonalen Antikörper (Ratte-anti-ChAT; Boehringer, Mannheim) wurde für 12h bei 4°C inkubiert. Die Verdünnung betrug 2µg/ml. Die Lösung enthielt zusätzlich: 2% Rinderserumalbumin (BSA), 5% Sucrose, 20% normales Kaninchenserum (NRS), 0.05% Natrium Azid 0,5%, Triton-X-100 in Tris-gepufferter Saline (TBS, 0,1m Tris, 0,15m NaCl, pH7,4). Anschließend folgte jeweils für eine Stunde eine Inkubation in einem Kaninchen-anti-Ratte Antikörper (Miles, Verdünnt 1:50 in 2% BSA, 5% Sucrose, 20% NRS in TBS) und Ratte-Peroxidase-anti-Peroxidase Antikörper (PAP) (Paesel, Verdünnung 1:100, Medien wie oben). Für die Peroxidasereaktion wurde das Gewebe 15 Minuten lang in 0,05%

3,3-Diaminobenzidine (DAB, Sigma) in PB vorinkubiert und nach Zugabe von 0,01% Wasserstoffperoxid für weitere 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Retinae mit Glycerin eingedeckt und die Deckgläser wurden mit Nagellack abgedichtet. In einigen Fällen wurde ein Tetramethyl-Rhodamine-Isothiocyanat gekoppelter Schaf-anti-Ratte Antikörper (GAR-TRITC) in Verdünnungen von 1:50 als zweiter Antikörper verwendet.

Zelldichten wurden bei einer Endvergrößerung von X400 mit Hilfe eines Zeichentubus gemessen. Für Zellkörperhistogramme wurden die Zellkörper mit einer Vergrößerung von X1000 gezeichnet. Von diesen Zeichnungen wurden Somaflächen mit einem semiautomatischen Bildanalysator (Leitz A.S.M.) ausgewertet. Aus den Flächen wurden die Durchmesser flächengleicher Kreise errechnet. Alle quantitativen Analysen wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit mit dem Lucifer Yellow Material an nicht dehydrierten Präparaten gemacht. Bei der Auswertung erfolgte keine Korrektur für Schrumpfung, die 5% linear betrug.

Intrazelluläre Injektion

Bei vierzehn Albinoratten und fünf pigmentierten Ratten (170-260g) wurden, nach tiefer Narkose mit Chloralhydrat, beide Augen entnommen und die Augenkammer hinter der ora serrata geöffnet. Das gesamte Auge wurde dann in 2% Paraformaldehyde (in 0,1M PB pH7,4) bei Raumtemperatur für eine Stunde fixiert. Nach völliger Entfernung der vorderen Augenkammer wurde die Retina vorsichtig vom Pigmentepithel abpräpariert. Kleine radiale Einschnitte wurden gemacht, um die Retina flach auf einem Deckglas auszubreiten. Ein Milliporefilter, mit einem Loch etwas kleiner als die Retina, hielt die Netzhaut während der Injektion flach in einer Petrischale. Der Boden der Petrischale war mit 0,1M PB (pH=7,4) bedeckt, so daß die Retina feucht gehalten wurde. Zur Injektion wurde ein Mikroskop mit feststehendem Objekttisch (Zeiss ACM) verwendet. Die intrazelluläre Füllung erfolgte mit einer 3% Lucifer Yellow Lösung (Stewart, '78,'81) unter Sichtkontrolle am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Filter

für Lucifer Yellow: BP 400-440, FT 460, LP 470; für Rhodaminefärbung: BP 546, FT 580, LP 590). Objektive mit langem Arbeitsabstand (Zeiss Plan 2,5/0,08; UD 20/0,057: UD 40/0,65) wurden auf 8mm Arbeitsabstand justiert.

Die Elektrode konnte in drei Achsen mit einem Huxley Mikromanipulator, der mit 30° gegen den Mikroskoptisch geneigt war, sehr genau bewegt werden. Mikropipetten wurden aus dickwandigen Kapillaren (Clark Electromedical Instruments; 1,0mm außen, 0,8mm innen Durchmesser) an einem Elektrodenziehgerät (David Kopf) gezogen und dann mit einer 3% Lucifer Yellow Lösung (in destilliertem Wasser) gefüllt. Der elektrische Kontakt wurde durch einen Platium-Iridium-Draht (Durchmesser=0,1mm, 90%:10%) hergestellt und der Farbstoff mit negativen Strömen injiziert. Ströme von 1-2nA für 5 Minuten waren nötig, um angestochene Zellen gut zu füllen. Bis zu 40 Zellen wurden pro Retina erfolgreich intrazellulär angefärbt, wobei das Präparat mehrere Tage hintereinander benutzt werden konnte.

Nach der Injektion wurde die Retina auf einen frischen Objektträger gebracht und mit Glycerin eingedeckt. Von gefüllten Zellen wurden mosaikartig mehrere Ausschnitte mit schwarz-weiß Film (Kodak Tri-X-pan) am Fluoreszenzmikroskop photographiert. Die Zellen wurden dann von den vergrößerten Negativen gezeichnet. Nach dem Photographieren wurden die Retinae in Puffer gewaschen und nach dem oben beschriebenen immunohistochemischen Verfahren gefärbt. Zur Erstellung von Vertikalschnitten wurden gefärbte Retinae zwischen Milliporefilter flach eingebettet. Anschließend wurden sie zusammen mit dem Filter entweder in Gelatine für Vibratomschnitte oder direkt in Tissue tec (Jung) für Kryostatschnitte eingebettet.

Die Somata von Lucifer Yellow gefüllten Zellen wurden von vergrößerten Photonegativen, bei einer Endvergrößerung von 1500X, gezeichnet und mit dem ASM ausgewertet.

Inkubation mit DAPI (4,6,Diamidino-2-Phenylindol) führt in der Kaninchenretina zu einer selektiven Anfärbung der cholinergen

Amakrinzellen (Masland, '83). Entsprechende Versuche bei der Ratte zeigen, daß die cholinergen Zellen dieser Tierart DAPI nicht aufnehmen. Die getesteten Konzentrationen reichten von 10-8 bis 10-2 molar. Die Retinae wurden entweder in DAPI inkubiert, oder die Lösungen wurden in 5µl Mengen in den Glaskörper injiziert. Die Endothelzellen der Blutgefäße färben sich selektiv bei 10-4 M an. Bei höheren Konzentrationen wird der Farbstoff unspezifisch von allen Neuronen und Gliazellen aufgenommen. Aus diesem Grunde müssen bei der Ratte die cholinergen Amakrinzellen ohne vorherige Markierung gesucht und angestochen werden.

Optische Nervdegeneration

Um eine Degeneration der Ganglienzellen zu erreichen, wurden zwei Albinoratten und zwei pigmentierte Ratten mit 4% Chloralhydrat narkotisiert. Hinter dem Auge wurde der optische Nerv freipräpariert und die Bindegewebshülle, die die optischen Axone umschließt, unter dem Operationsmikroskop teilweise geöffnet. Es wurde darauf geachtet, daß die Blutgefäße, die parallel mit den Axonen ins Auge laufen, nicht beschädigt wurden. Die Axonbündel wurden mit einer feinen Schere innerhalb der geöffneten Bindegewebshülle durchtrennt. Die Beibehaltung der retinalen Blutversorgung wurde nach der Operation und drei Monate später, vor dem Experiment, mit Hilfe eines Augenspiegels geprüft. Beide Retinae einer Albinoratte und einer pigmentierten Ratte wurden für die Immunohistochemie aufgearbeitet und anschließend mit Kresylviolet gegengefärbt.

III.3. ERGEBNISSE

Acetylcholintransferase positive Zellen in vertikalen Schnitten

In der Rattenretina färbt ein Antikörper gegen Acetylcholintransferase (ChAT) zwei Typen von Zellen (Abb.9). Die eine Population hat den Zellkörper an der inneren Kante der inneren nukleären Schicht (INL), wo Amakrinzellen normalerweise zu finden sind. Die Dendriten verzweigen sich in einem eng begrenzten Band im äußeren Drittel der inneren plexiformen Schicht (IPL). Die Zellen der anderen Population haben ihre Zellkörper in der Ganglienzellschicht (GCL) und die Dendritenverzweigungen liegen im zentralen Drittel der inneren plexiformen Schicht. Bei diesen Zellen handelt es sich sehr wahrscheinlich um versetzte Amakrinzellen. Die Position beider Dendritenbänder innerhalb der inneren pexiformen Schicht und der Abstand zwischen ihnen ist konstant. Die Position der Zellkörper ist mehr variabel und hängt stark vom umgebenden Gewebe ab. Normalerweise liegen die Zellkörper der versetzten Zellen in der Ganglienzellschicht an der inneren Kante der Retina (Abb.9B). Teilweise werden sie aber durch Axonbündel oder Blutgefäße von ihrer normalen Position verdrängt. Einige wenige Zellen haben sogar ihre Zellkörper zwischen den beiden Strata (Abb.9C). Eine Analyse von retinalen Totalpräparaten zeigt, daß solche "interstitiellen Zellen" in sehr geringen Dichten von 2 bis 6 Zellen pro Quadratmillimeter vorkommen. Bedingt durch ihre Position zwischen den Bändern, ist es nicht möglich zu entscheiden, in welchen der beiden Plexi sie ihre Fortsätze senden (inneren, äußeren, oder beide) und damit, zu welcher Population sie gehören. Da diese interstitiellen Zellen mit weniger als 0,5% der gesamten cholinergen Zelldichte äußerst selten vorkommen, ist der Fehler, der bei einer falschen Zuordnung entsteht, vernachlässigbar. In einer Retina wurden drei benachbarte Zellen gefunden, die ihre Zellkörper an der äußeren Grenze der inneren nukleären Schicht hatten, d.h., dort wo die Horizontalzellen sich befinden. Diese Zellen waren offensichtlich während des retinalen Wachstums durch ein Blutgefäß verlagert worden, das durch ihre Dendritenbäume hindurch lief. Ihre Dendriten projizierten durch

die innere nukleäre Schicht hindurch und stratifizierten richtig im äußeren Stratum.

Die beiden cholinergen Strata sind nicht symmetrisch in der inneren plexiformen Schicht angeordnet (Abb.10). Der Abstand von der inneren nukleären Schicht zum äußeren cholinergen Band beträgt 25% der inneren plexiformen Schicht. Der Abstand des inneren cholinergen Bandes zur Ganglienzellschicht beträgt dagegen 45%.

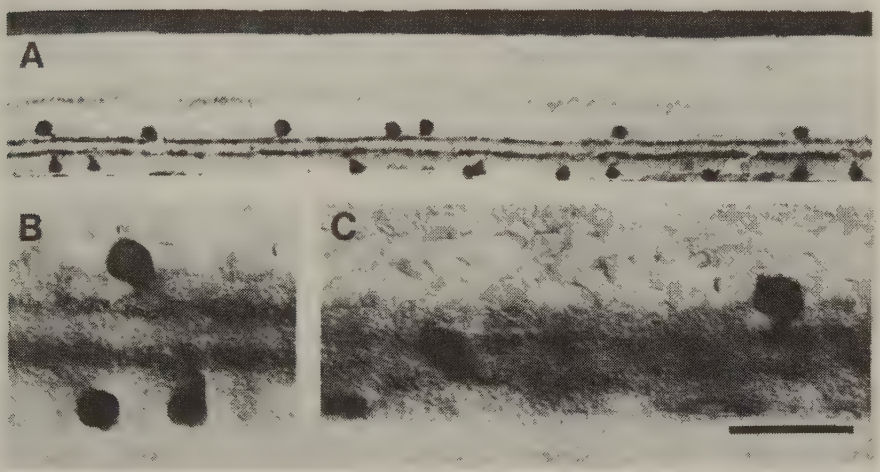

Abb.9 - A. Übersichtsaufnahme eines Vertikalschnittes durch eine Rattenretina, die mit einem Antikörper gegen Acetylcholintransferase gefärbt war (eine Schemazeichnung dieses Schnittes, mit Angabe der Retinaschichtung ist in Abb.10 gezeigt). Der Antikörper bindet an zwei cholinerge Zellpopulationen. Eine Population mit dem Zellkörper in der inneren nukleären Schicht hat Dendritenverzweigungen in einem schmalen Band im äußeren Drittel der inneren plexiformen Schicht. Die andere Population, mit dem Zellkörper in der Ganglienzellschicht, stratifiziert ungefähr in der Mitte der inneren plexiformen Schicht. Die Dicke der Retina beträgt 116µm. B., Mikrophotographie der inneren plexiformen Schicht zur Erläuterung der normalen Position der beiden Zellpopulationen. C., Der seltene Fall einer ChAT positiven Zelle, die mit ihrem Zellkörper zwischen den beiden Strata liegt. Diese spezielle Zelle hatte einen Primärdendriten, der in das Innere der beiden Acetylcholinbänder projiziert, analog den cholinergen Zellen der Ganglienzellschicht. Skala: 25µm für B und C.

ChAT positive Zellen im Totalpräparat

Es ist schwierig in Vertikalschnitten die Verteilung und die Dichte einer Zellpopulation abzuschätzen. Das retinale Totalpräparat ist dagegen ideal dazu geeignet, eine Zellpopulation quantitativ zu erfassen. Ein Blick auf die ChAT positiven Zellen in einem solchen retinalen Totalpräparat der Ratte zeigt, daß beiden Populationen sehr ähnlich in Dichte, Verteilung und Somagröße sind (Abb.11).

Vergleicht man einen peripheren mit einem zentralen retinalen Bereich, so zeigt sich ein klarer Anstieg in der Zelldichte für beide Populationen (Abb.12A,B). Das Feld mit der hohen Zelldichte (Feld B) enthält 1220 ChAT positive Zellen/mm²; 626 Zellen/mm² gehören zur Ganglienzellschicht und 594 Zellen/mm² gehören zur Amakrinzellschicht. In dem Feld mit der niedrigen Dichte befinden sich 782 Zellen/mm², wovon 423 Zellen/mm² in der Ganglienzellschicht und 359 Zellen/mm² in der Amakrinzellschicht liegen. In beiden Fällen ist die Dichte in der Ganglienzellschicht leicht höher als in der Amakrinzellschicht.

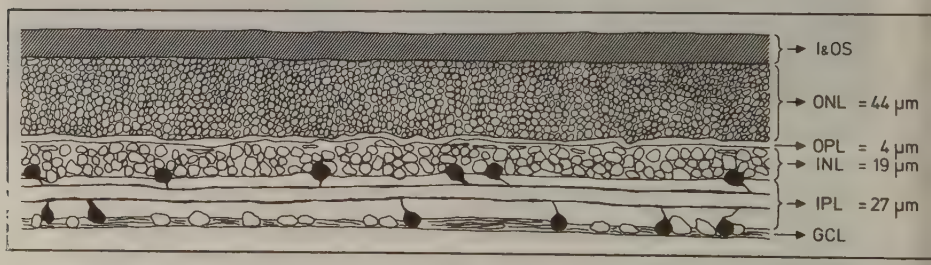

Abb.10 - Zeichnung des Schnittes von Abbildung 9A. Die ChAT positiven Zellen sind schwarz gezeichnet. Auf der rechten Seite sind die ungefähren auf dem Objekträger gemessenen Dicken der retinalen Schichten angegeben. Etwas mehr als die Hälfte der vertikalen Ausdehnung wird von den Photorezeptoren eingenommen. Alle übrigen Schichten teilen sich die verbleibende Hälfte. I&OS= innere und äußere Segmente der Photorezeptoren, ONL= äußere nukleäre Schicht, OPL=äußere plexiforme Schicht, INL=innere nukleäre Schicht, IPL= innere plexiforme Schicht, GCL=Ganglienzellschicht.

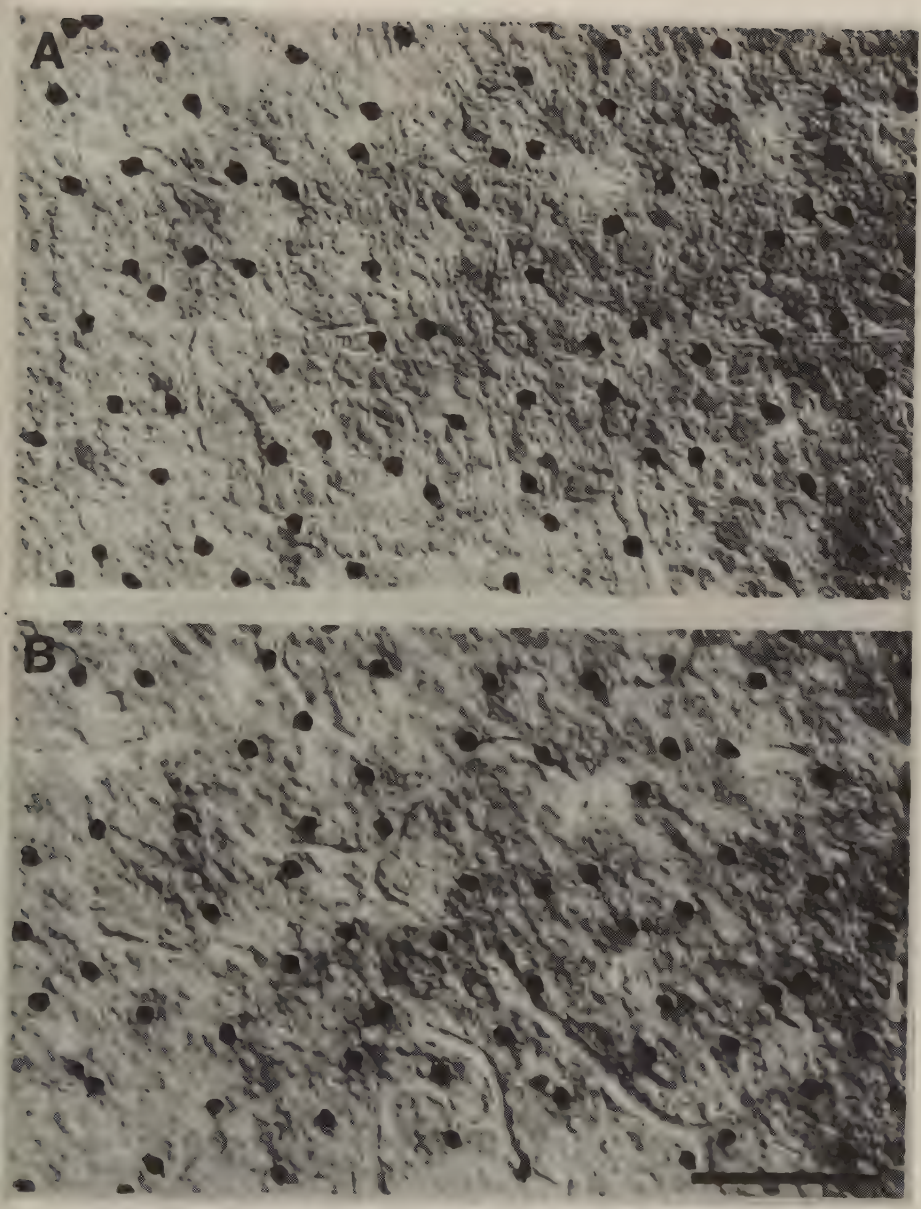

Abb.11 - A. Mikrophotographie (Normarski-Interferenzkontrast) von den ChAT-positiven Zellen in der Ganglienzellschicht. B. Das gleiche Feld mit der Fokusebene auf der Population in der Amakrinzellschicht. Skala: 100µm.

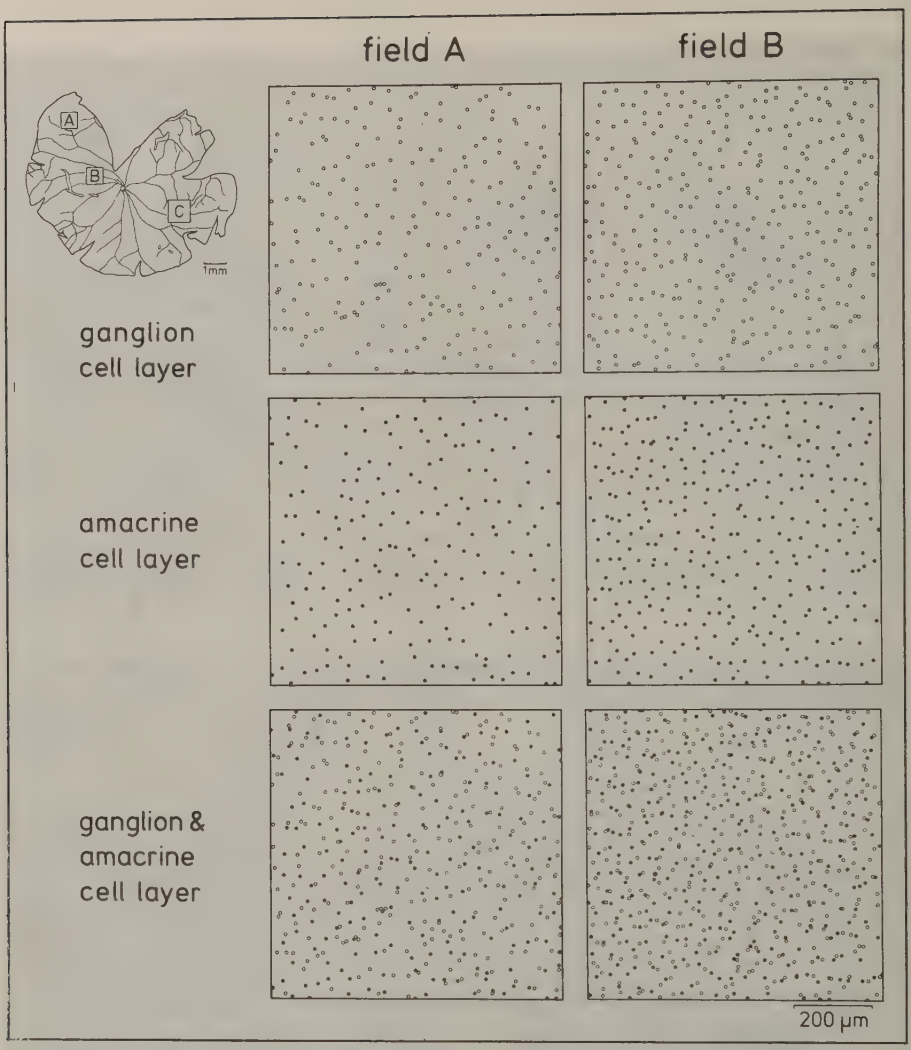

Abb.12 - Die örtliche Verteilung der cholinergen Amakrinzellen: In der rechten Retina einer pigmentierten Ratte (kleine Übersichtskarte), wurden drei Felder eingehend untersucht. Bei A und B sind jeweils die cholinergen Zellen in Feldern von 750X750µm gezeichnet. A stammt aus einem Dichtebereich von 782 Zellen/mm², B lag nahe der area centralis und hatte eine Dichte von 1220 Zellen/mm². Oben ist die Population der cholinergen Amakrinzellen in der Ganglienzellschicht gezeigt, in der Mitte die der Amakrinzellschicht und unten sind beide überlagert gezeichnet. Das in der Retinakarte oben links markiert Feld C wurde benutzt, um die "Nächster-Nachbar-Analyse" (Abb.15) und die Messung der Somadurchmesser (Abb.21) zu machen.

Abbildung 13 zeigt die Änderung der Dichte entlang zweier Vektoren (superior-inferior und nasal-temporal) in der Retina einer pigmentierten Ratte (gleiche Retina wie in Abbildung 12). Die Zellzahl sinkt von 1324 Zellen/mm² (GCL=648, INL=676) am Punkt der höchsten Zelldichte, auf 616 Zellen/mm² (GCL=332, INL=284) in der Peripherie der oberen temporalen Retina. Der Punkt der höchsten Zelldichte, der sich 1,5mm vom blinden Fleck entfernt befindet, ist vermutlich der Ort höchster Ganglienzelldichte (Fukuda,'77; Schober und Gruschka, '77). Die Änderung der Dichte entlang des von oben nach unten zeigenden Vektors entspricht einer Abnahme um den Faktor von 2,1. In naso-temporaler Richtung ändert sich die Dichte nur um den Faktor von 1,4. Eine zusätzlich untersuchte Albinoratte lieferte ähnliche Werte. Die Dichte änderte sich um den Faktor 1,9 von der area centralis (AC = Ort höchster Ganglienzelldichte) zur superioren Retina und um den Faktor von 1,4 von nasaler in temporaler Richtung. Diese Werte zeigen, daß die cholinerge Zelldichte in der oberen Netzhautperipherie am niedrigsten ist.

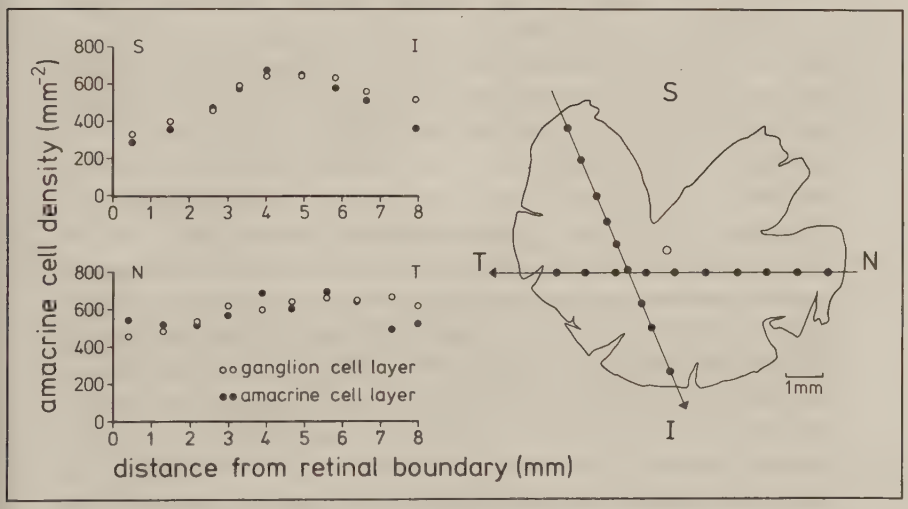

Abb.13 - Änderung der cholinergen Zelldichte entlang von zwei Schnittlinien durch die Netzhaut. Fast überall ist die Dichte in der Ganglienzellschicht (offene Kreise) in etwa gleich der Dichte in der Amakrinzellschicht (geschlossene Kreise). Der Ort auf der Retina (X-Achse) ist als Abstand vom Retinarand aufgetragen (siehe Karte). S = superior; I = inferior; T = temporal; N = nasal.

Bei allen untersuchten Retinae waren die Dichten der cholinergen Amakrinzellen in der inneren nukleären Schicht und in der Ganglienzellschicht nahezu identisch, wenn man von statistischen Schwankungen absieht (Abb.14). Summiert man die Zelldichten aller ausgezählten Felder, so findet man bei der pigmentierten Ratte 51% der cholinergen Amakrinzellen in der Ganglienzellschicht, bei der Albinoratte 50%.

Mosaik der ChAT positiven Zellen

Die örtliche Verteilung der Zellkörper wurde für beide Populationen mit Hilfe einer "Nächster-Nachbar-Analyse" (Wässle und Riemann,'78) untersucht. Für diese Analyse wurde ein Feld mittlerer Zelldichte aus der inferioren nasalen Retina ausgewählt (Abb.12 Übersicht, Feld C). In diesem 1mm² großen Feld wurden 1034 ChAT positive Zellen gezählt (GCL=522, INL=512). Die Summe der Abstände aller Zellen zu ihrem nächsten Nachbarn ergibt eine Gaußverteilung (Abb.15). Die gegenseitigen Abstände streuen um eine mittlere Distanz und dies spricht für eine reguläre Anordnung der Zellkörper. Eine zufällige Verteilung der Zellen hätte die Form einer Poissonverteilung (gestrichelte Linie in Abbildung 15). Der mittlere Abstand zum nächsten Nachbarn ist in beiden Populationen ähnlich. Er beträgt 27,1µm (S.D.= 9,6) für die Population in der Ganglienzellschicht und 31,5µm (S.D. = 7,1) für die Population in der Amakrinzellschicht. Beide Histogramme unterscheiden sich in ihrer Breite, was bedeutet, daß die Ganglienzellpopulation weniger regulär angeordnet ist, als die Amakrinzellpopulation. Ein Maß für diese Regularität ist der Quotient aus dem mittleren Abstand (x) zwischen den Zellen und der Standardabweichung (s). Je höher dieser Quotient ist, um so schmäler ist das Histogramm und um so regulärer ist das Muster (Wässle und Riemann,'78). Die Population in der Amakrinzellschicht hat ein Verhältnis von Mittelwert zu Standardabweichung von 4,4 (Dichte = 512 Zellen/mm²), während die Ganglienzellpopulation einen niedrigeren Quotienten von 2,8 (Dichte = 522 Zell/mm²) hat. Diesen Unterschied in der Ordnung kann man in Abbildung 12 auch mit bloßem Auge erkennen. In beiden Feldern gibt es mehr Zellpaare in der Ganglienzellschicht als in der Amakrinzellschicht.

Abb.14 - Dichtemessungen der cholinergen Zellen in der Retina (gleiche Retina wie Abbildung 12). Jedes ausgewertete Feld hat eine Abmessung von 500X500µm. Die Zahlenwerte in den Feldern geben aktuelle Zellzahlen in diesen 0,25mm² an. Positive Differenzen bedeuten einen Überschuß in der Ganglienzellschicht; negative Differenzen bedeuten einen Überschuß in der Amakrinzellschicht.

Morphologie der ChAT positiven Zellen

Die Beschreibung der cholinergen Zellen aus Nissl gefärbten Kaninchenretinae ("coronate cells", Hughes und Vaney,'80) paßt auch für die cholinergen Zellen in Nissl gefärbten Rattenretinae (Abb.16). Bei der Ratte haben diese Zellen einen ähnlich kappenförmigen Kern mit einer Krone aus Cytoplasma, der ihnen im Kaninchen ihren Namen gegeben hat. In ChAT positiven Amakrinzellen ist der kappenförmige Kern deutlich zu erkennen. Eine Gegenfärbung von ChAT gefärbten Retinae mit Kresylviolet zeigt, daß die "coronate" Zellen der Ratte die cholinergen Amakrinzellen sind. Die "coronate" Zellen der Kaninchenretina können durch eine reduzierte Silberfärbung angefärbt werden (Vaney et al.,'81). Bei der Ratte lassen sich diese Zellen mit dieser Methode nicht färben (Persönliche Mitteilung von Herrn Dr.L.Peichl).

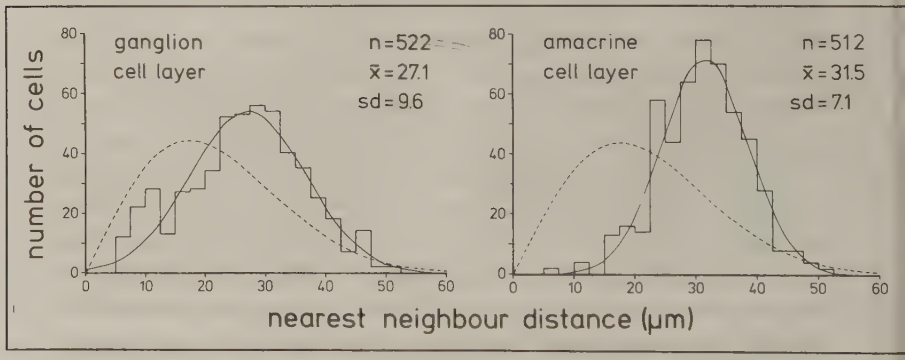

Abb.15 - "Nächster-Nachbar-Analyse" der cholinergen Amakrinzellen in Feld C von Abbildung 12. Die Histogramme zeigen die in diesem Feld gemessenen Abstände aller Zellen zu ihrem nächsten Nachbarn. Die Gaußfunktion (durchgezogene Linie) wurde mit dem aus den Histogrammen ermittelten Mittelwert und der Standardabweichung berechnet. Die Poissonfunktion (gestrichelte Linie) zeigt die Verteilung, die ein zufällig angeordnetes Punktemuster mit der gleicher Teilchendichte hätte. (vergleiche Wässle und Riemann, '78).

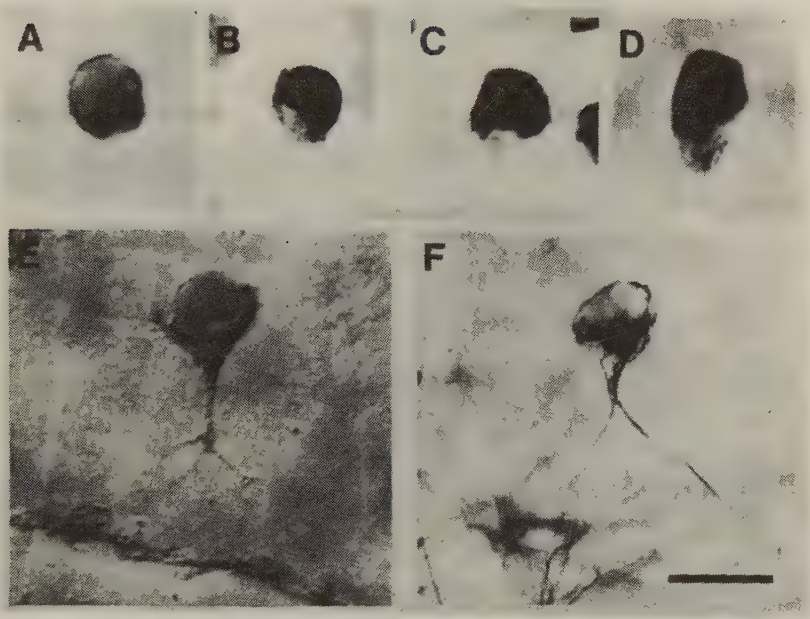

Abb.16 - A-C. Mikrophotographien von einzelnen Zellen aus der Rattenretina. Diese Zellen schauen sehr ähnlich aus wie die von Hughes und Vaney ('80) beim Kaninchen beschrieben "coronate" Zellen. Bei den Kaninchen "coronate" Zellen konnte gezeigt werden, daß sie Acetylcholin als Transmitter benutzen. A. Eine ChAT positive Amakrinzelle, die den typischen exzentrischen kappenförmigen Kern hat. B. ChAT positive Zelle die mit Kresylviolet gegengefärbt wurde. Der kappenförmige Kern zeigt den blauen basischen Farbstoff, wogegen das Cytoplasma das braune Reaktionsprodukt der immunohistochemischen Reaktion enthält. C. Eine "coronate" Zelle aus der Rattenretina nur mit Kresylviolet gefärbt. D. Zum Vergleich eine Kresylviolet gefärbte "coronate" Zelle aus dem Kaninchen. E. Normarski-Interferenzkontrast-Mikrophotographie einer ChAT positiven Zelle bei der Ratte. F. Eine "coronate" Zelle aus dem Kaninchen, die mit einer reduzierten Silbermethode gefärbt wurde. Die Ähnlichkeit dieser Zellen aus beiden Tierarten (E und F) ist augenfällig. Skala:10µm für A-F. (Die Mikrophotographien D und F stammen von Präparaten, die freundlicherweise von Herrn L.Peichl zur Verfügung gestellt wurden).

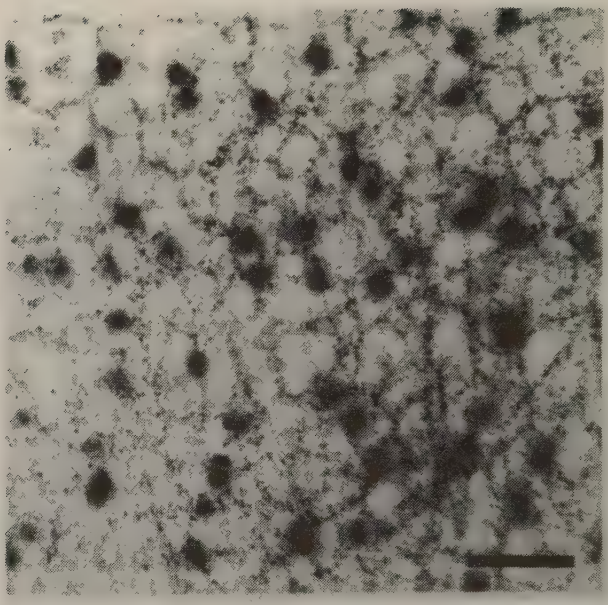

Abb.17 - Mikrophotographische Aufnahme des äußeren cholinergen Plexus in der inneren plexiformen Schicht. Deutlich ist das feine Netzwerk der ChAT-positiven Dendriten zu sehen. Die dazugehörigen Zellkörper liegen in der Amakrinzellschicht außerhalb der Fokusebene. Skala:50µm.

Das Dendriten-Netzwerk der ChAT positiven Zellen

Der Vertikalschnitt in Abbildung 9 zeigt, daß die Dendritenverzweigungen der beiden cholinergen Zellpopulationen je ein dünnes Band innerhalb der inneren plexiformen Schicht ausbilden. In den Totalpräparaten sieht man, wie die Dendriten in einem solchen Stratum angeordnet sind. Beide Plexi bestehen aus einem dichten varikositätenreichen Netzwerk (Abb.17). Die Dendriten einer individuellen Zelle können nur über ein kurzes Anfangsstück hinweg verfolgt werden, bevor man sie in dem dichten, von den Nachbarzellen gebildeten Plexus verliert. Auffällig sind die vielen unregelmäßigen Löcher, die interessanterweise in beiden Strata nicht deckungsgleich sind.

Durchtrennung des Optischen Nerven

Drei Monate nach einer Durchtrennung des Optischen Nerven sind die meisten Ganglienzellen degeneriert (Abb.18), was zu einer drastischen Reduktion der Zelldichte führt. Die kleineren ChAT-positiven Zellkörper sind unter den Zellen, die die Nervdurchtrennung überleben. Da es deshalb unwahrscheinlich ist, daß sie ein Axon besitzen, zeigt dieser Versuch, daß sie echte Amakrinzellen sind, die mit ihren Zellkörpern in der Ganglienzellschicht liegen.

Intrazelluläre Injektion des Fluoreszensfarbstoffes Lucifer Yellow

In der Kaninchenretina haben die cholinergen Zellen die Eigenschaft selektiv den Fluoreszensfarbstoff DAPI (4,6,Diamidino-2-Phenylindol) aufzunehmen (Masland,'83). Nachdem man dieses entdeckt hatte, war es möglich, solche Zellen gezielt mit einer Mikroelektrode anzustechen und durch Füllung mit Lucifer Yellow ihre gesamte dendritische Morphologie zu entschlüsseln. Bei der Ratte färbt DAPI in niedrigen Konzentrationen alle Endothelzellen der Blutgefäße. In höheren Konzentrationen wird es von allen retinalen Zellen einschließlich der Gliazellen aufgenommen. Es ist somit zur Markierung der cholinergen Zellen in der Rattenretina ungeeignet.

Aus diesem Grund mußten retinale Zellen nach dem Prinzip von Versuch und Irrtum ohne vorherige Markierung intrazellulär injiziert werden. Bei einer solchen Suche finden sich in einer Retina unter 40 injizierten Zellen, 1 bis 3 Zellen, die eine Morphologie haben, wie sie in Abbildungen 19 und 20 gezeigt wird. Diese Zellen haben einen kleinen runden Zellkörper und einen radiärsymmetrischen Dendritenbaum, der von drei bis sieben primären Dendriten gebildet wird. Die Dendriten entspringen entweder von einem kurzen Stiel (Abb.20 A,B) oder direkt aus dem Zellkörper (Abb.20 C-H). Sie überkreuzen sich nur selten und haben viele feine Varikositäten an ihren stark verzweigten distalen Teilen. Die Dendritenverzweigungen

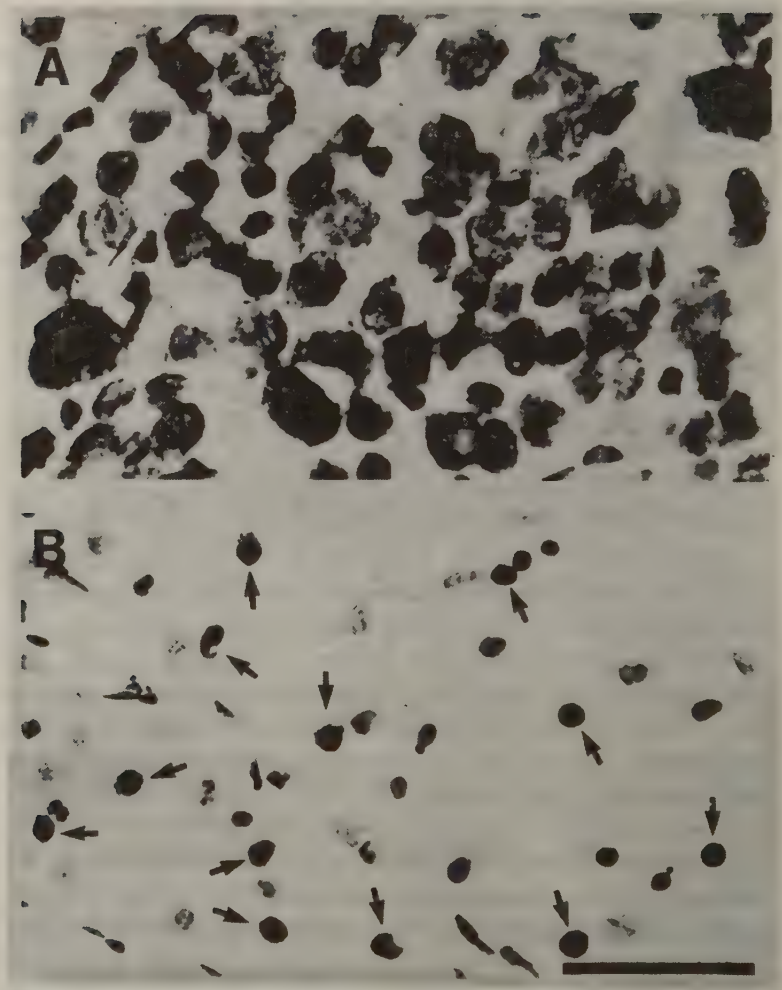

Abb.18 - A. Ganglienzellschicht einer normalen Nissl gefärbten Rattenretina. B. Ganglienzellschicht einer Rattenretina drei Monate nach Durchtrennung der optischen Nervenfasern. Die Retina wurde mit Antikörper gegen Acetylcholintransferase gefärbt und anschließend mit Kresylviolet gegengefärbt. Alle großen Ganglienzellkörper sind auf Grund ihrer Axondurchtrennung degeneriert. Die kleinen Zellen sind entweder Amakrinzellen oder Astrozyten. Die Pfeile markieren ChAT positive Zellen. Skala:50µm.

liegen in einer eng umgrenzten Ebene innerhalb der inneren plexiformen Schicht. Die Zellen kommen in zwei Arten vor. Ein Typus hat den Zellkörper in der Amakrinzellschicht (Abb.19, Abb 20 G,H). Diese Zellen stratifizieren mit den Dendriten im äußeren Drittel der inneren plexiformen Schicht. Der andere Typus hat seinen Zellkörper in der Ganglienzellschicht (Abb.20 A-F) und die Dendritenebene liegt in der Mitte der inneren plexiformen Schicht. Beide Arten sind in ihrer Zellkörperform und in der Morphologie ihrer Dendritenbäume sehr ähnlich. Sie unterscheiden sich nur durch die Lage ihrer Zellkörper und die Ebene der Dendritenverzweigungen in der inneren plexiformen Schicht. Während sich bei intrazellulär injizierten Ganglienzellen immer das Axon mit anfärbt, wurde bei diesen Zellen nie ein Axon beobachtet. Die Morphologie dieser Zellen in Analogie zum Kaninchen und die Ebene ihrer Dendritenverzweigungen machen es wahrscheinlich, daß diese beiden Typen die versetzte und normale Population einer gesamten Amakrinzellklasse darstellen. Sie sind vermutlich identisch mit der von Perry and Walker ('80) aus Golgi-Material in der Rattenretina beschriebenen "Typ(a) narrow-field unistratified" Amakrinzelle.

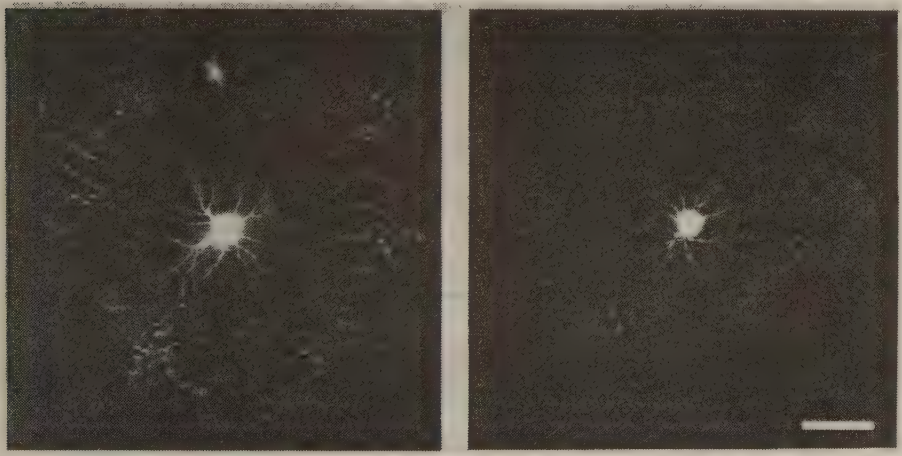

Abb.19 - Fluoreszenzaufnahme von zwei Amakrinzellen, die intrazellulär mit dem Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow injiziert wurden. Sie hatten ihre Zellkörper in der Amakrinzellschicht. Die Zellen haben Ähnlichkeit mit Photographien von explodierenden Feuerwerkskörpern. Deshalb wurde ihnen der Name "starburst"-Zellen verliehen. Skala:50µm.

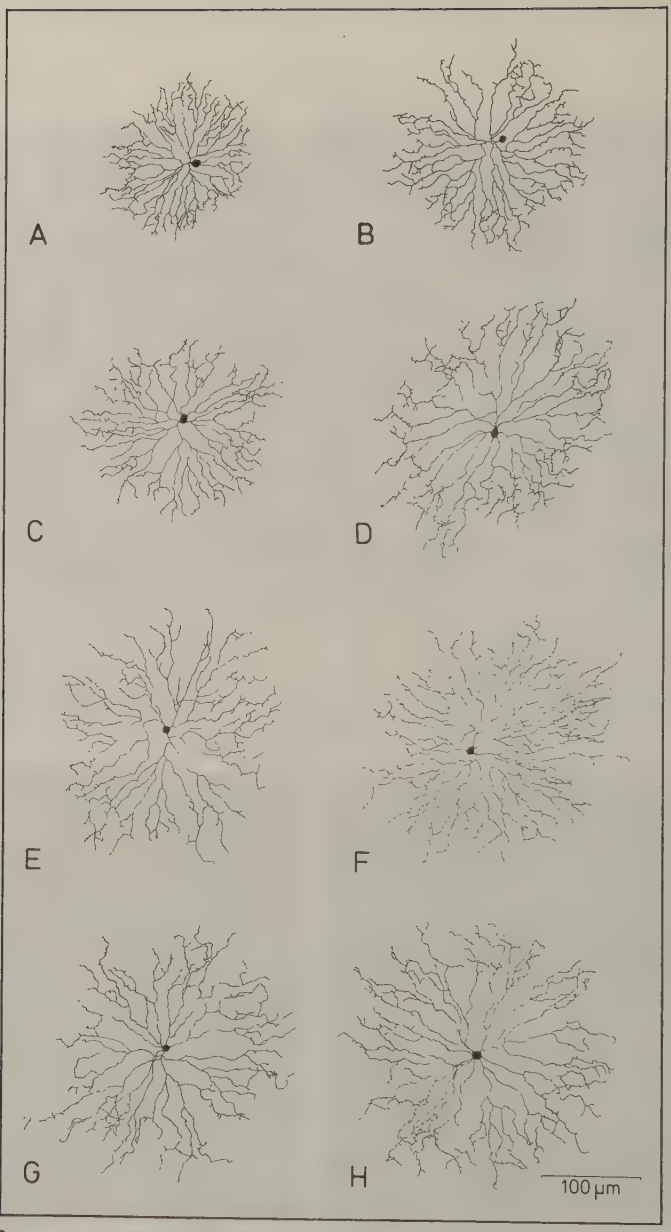

Abb.20 - Zeichnungen verschiedener Lucifer Yellow gefüllter Amakrinzellen mit "starburst" ähnlichem Aussehen. A-F: Zellen aus der Ganglienzellschicht. G,H: Zellen aus der Amakrinzellschicht.

Dendritenbaumgröße

Bei den meisten retinalen Neuronen ändert sich die Größe des Dendritenbaumes umgekehrt proportional zur Zelldichte. Bei der Ratte kann der Ort höchster neuronaler Zelldichte (area centralis) nicht durch das Muster der retinalen Blutgefäße, wie bei der Katze, oder durch das myelinisierte Axonband, wie beim Kaninchen, festgelegt werden. Deshalb wurde, wie auch in anderen Arbeiten bei der Ratte (Perry,'79), der blinde Fleck (optic disc = OD) als Referenzpunkt ausgewählt. Abbildung 21 zeigt die Dendritenbaumgröße dieser Amakrinzellen in Abhängigkeit des Abstandes vom blinden Fleck. Die eingezeichneten Regressionsgeraden zeigen, daß in beiden

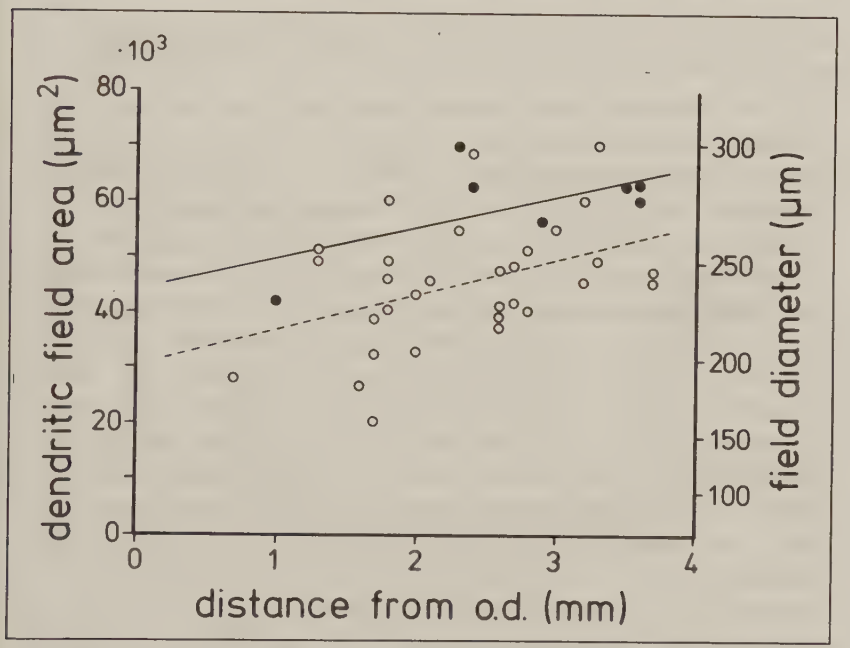

Abb.21 - Dendritenbaumdurchmesser und Dendritenbaumflächen der Lucifer Yellow injizierten Zellen als Funktion des Abstandes vom blinden Fleck. (GCL = offene Kreise, n = 31; IPL = geschlossene Kreise, n = 7). Beide Regressionsgeraden (GCL = gestrichelte Linie, INL = durchgezogene Linie) zeigen ein Anwachsen der Dendritenbäume vom Zentrum zur Peripherie hin.

Populationen die Dendritenbaumgröße vom Zentrum zur Peripherie hin zunimmt. Die Durchmesser der Dendritenbäume reichen von 160µm (Dendritenbaumfläche = 20000µm²) bis 300µm (Fläche = 70000µm²). Der Durchmesser ändert sich somit vom Zentrum zur Peripherie um den Faktor 1,9 und die Fläche um den Faktor 3,5. Die Streuung ist bei 1,0-2,0mm Abstand vom blinden Fleck am größten. Dies spiegelt die Tatsache wieder, daß die area centralis (AC) 1,0-2,0mm von dem blinden Fleck entfernt liegt (Fukuda,'77; Schober und Gruschka,'77). Die Streuung entsteht bei dieser Art von Darstellung zwangsläufig, weil Daten aus dem Bereich der area centralis mit solchen, die 1,5mm in der entgegengesetzten Richtung vom blinden Fleck liegen, zusammen gewürfelt werden.

Vergleich von ChAT positiven und Lucifer Yellow gefärbten Zellen

Beim Kaninchen konnte gezeigt werden, daß Amakrinzellen, die eine ähnliche Morphologie wie die hier bei der Ratte mit Lucifer Yellow gefüllten Zellen haben, Acetylcholin als Transmitter verwenden. Dies soll nun in den folgenden Abschnitten für die Rattenretina untersucht werden. Bei allen ChAT-positiven Zellen der "Nächster-Nachbar-Analyse" (Abb.12 Übersicht, Feld C), wurde auch der Zellkörperdurchmesser gemessen (Abb.22). Die Zellen in der Ganglienzellschicht sind mit einem mittleren Durchmesser von 9,1µm (S.D.=0,7; n=522) geringfügig kleiner als die in der Amakrinzellschicht, die einen mittleren Durchmesser von 9,4µm (S.D.=0,6; n=512) haben. Für die Lucifer Yellow gefüllten Zellen wurden ebenfalls die Somadurchmesser bestimmt (Abb.22, schwarze Balken). Der mittlere Zellkörperdurchmesser dieser Zellen beträgt in der Ganglienzellschicht 9,4µm (S.D.=0,9; n=31) und in der Amakrinzellschicht 8,7µm (S.D.=0,7; n=7). Er liegt im selben Bereich wie die Zellkörper der ChAT-positiven Zellen.

Die Somata der ChAT-positiven Zellen sind den Zellkörpern der Lucifer Yellow gefüllten Zellen sehr ähnlich. Mit beiden Färbemethoden haben die Zellen ein rundes Soma, wenn man sie in Totalpräparaten betrachtet, sehen aber in Vertikalschnitten birnenförmig aus. Sehr oft haben diese Zellen einen einzigen

primären Dendriten, der vom Zellkörper aus senkrecht bis in das cholinerge Stratum herunter läuft, und erst dann anfängt sich zu verzweigen (Abb.16 E; 20 A,B). Andere Zellen haben drei oder mehr Primärdendriten, die dann schräg über längere Distanzen bis zum Ort ihrer weiteren Verzweigung ziehen, wo sie sich mit den anderen Dendriten vermischen (Abb 20 C-H). Vertikale Primärdendriten kommen häufiger bei mehr zentral gelegenen Zellen vor, schräg laufende Primärdendriten sind hauptsächlich in der peripheren Retina anzutreffen.

Doppelfärbungsexperimente

Eine Gegenfärbung von Lucifer Yellow injiziertem Gewebe mit der immunhistochemischen Peroxidase-Anti-Peroxidase Methode ver-

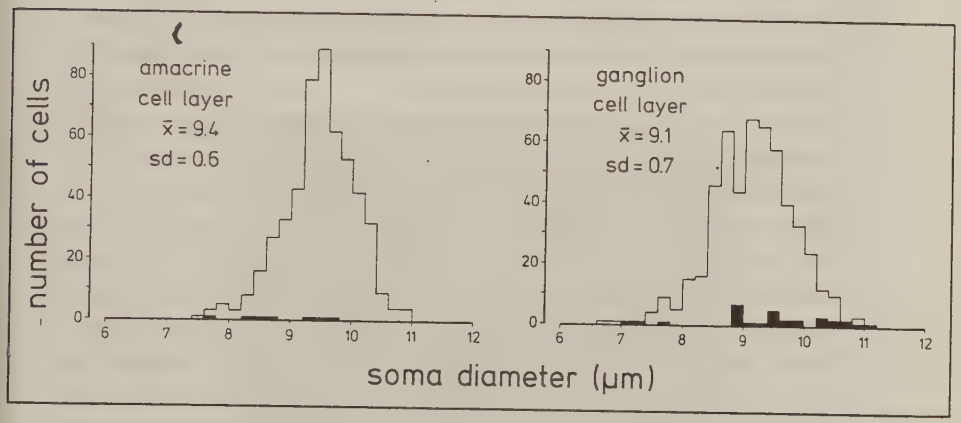

Abb.22 - Histogramme der Zellkörperdurchmesser von ChAT positiven Zellen (äußere Histogramme) und von Lucifer Yellow injizierten Zellen (schwarze Blöcke). Die Zellkörperdurchmesser der ChAT positiven Zellen wurde in Feld C, Abbildung 12 gemessen (GCL = 522 Zellen, INL = 512 Zellen). Die Zellen der Ganglienzellschicht haben etwas kleinere Somadurchmesser als die der Amakrinzellschicht. Die Zellkörper der Lucifer Yellow injizierten Zellen (GCL = 31 Zellen, INL = 7 Zellen) haben einen mittleren Durchmesser von 9,4µm (S.D.= 0,9) in der Ganglienzellschicht und 8,7µm (S.D. = 0,7) in der Amakrinzellschicht. Ihre Somagröße ist somit vergleichbar mit der Größe der ChAT positiven Zellen.

schlechtert die Qualität des Fluoreszensfarbstoffes erheblich. In den meisten Fällen war nur noch die zuvor sehr intensive Fluoreszenz des Zellkörpers ausreichend hell. Die meisten Dendriten und feinen Fortsätze bleichten aus. Bei allen Versuchen, Lucifer Yellow injizierte Amakrinzellen mit dem Antikörper gegen Acetylcholintransferase gegenzufärben, konnte keine überzeugende Doppelfärbung erreicht werden. Obwohl alle umliegenden cholinergen Zellen gut gefärbt waren, zeigten die mutmaßlich cholinergen mit Lucifer Yellow gefüllten Zellen kein immunohistochemisches Reaktionsprodukt. Dieses gilt auch für alle mit Lucifer Yellow gefüllten Ganglienzellen und für alle anderen normalen und versetzten Amakrinzellen.

Eine immunhistochemische Gegenfärbung mit einem an Rhodamin gekoppelten zweiten Antikörper, der ein von Lucifer Yellow verschiedenes Emmissionspektrum hat, verschlechtert die Intensität des injizierten Lucifer Yellows nicht. Dieses läßt vermuten, daß der Oxidationsschritt während der Peroxidase-anti-Peroxidase Methode den Farbstoff zerstört. Nichtsdestoweniger ist eine Gegenfärbung mit Rhodamin ebenfalls problematisch. Der sehr intensiv fluoreszierende Zellkörper jeder mit Lucifer Yellow gefüllten Zelle ist in der Filterkombination für Rhodamin genauso hell zu sehen, wie die mit Antikörper gefärbten umliegenden Zellen. Aus diesem Grunde ist es nicht möglich zu entscheiden, ob ein Neuron doppelt gefärbt ist oder nicht. Der Versuch, die Helligkeit des Lucifer Yellows vor der immunohistochemischen Färbung durch ausbleichen zu reduzieren, zeigte, daß die oxidierte Form des Fluoreszensfarbstoffes stärker im roten emittiert als die unoxidierte Form. Dieses erklärt die Beobachtung, warum Lucifer Yellow nach einiger Zeit der Belichtung mit dem Rhodaminfilter immer heller wurde, wogegen die umliegenden ChAT positiven Zellen zunehmend ausbleichten. Es ist somit mit beiden immunhistochemischen Methoden nicht möglich, beide Färbungen überzeugend und zweifelsfrei in einer Zelle zu erhalten. Deshalb konnte der Beweis für die Gleichheit der Lucifer Yellow gefüllten Zellen mit den ChAT gefärbten Zellen nur indirekt erbracht werden. Doppelt gefärbte Totalpräparate zeigen, daß Lucifer Yellow gefüllte Zellen des hier beschriebenen Types, genau in das Mosaik von ChAT

positiven Zellen passen (Abb.23,25). Es würde immer eine unerwartete Leerstelle im Zellmosaik auftreten, wenn die gefüllte Zelle nicht Mitglied der ChAT positiven Zellpopulation wäre. Bei den immunhistochemischen Präparaten lassen sich, wie bereits erwähnt, nur die primären Dendriten der einzelnen Zellen auf ca. 50µm Länge unterscheiden. Über größere Strecken können sie im dichten Netz der Dendriten nicht mehr von Nachbarzellen unterschieden werden, wodurch man nur einen beschränkten Eindruck von ihrer Gesamtgestalt bekommt. Doch dieses rudimentäre Zellbild paßt genau auf die Lucifer Yellow gefüllten Zellen.

Bei einer Analyse von doppelt gefärbten Vertikalschnitten findet man, daß die Dendriten von Lucifer Yellow gefärbten Zellen genau in dem sehr dünnen ChAT positiven Band zu finden sind, das von den immunhistochemisch gefärbten Dendriten der Nachbarzellen gebildet wird (Abb.24). Das Einfügen der Lucifer gefüllten Zellen in das Mosaik der ChAT gefüllten Zellen, die Übereinstimmung in der rudimentären Zellgestalt und das identische Stratifizierungsmuster

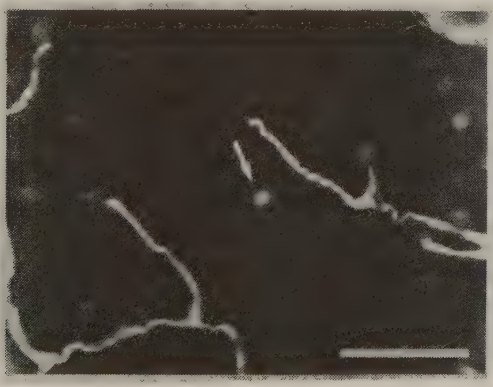

Abb.23 - Fluoreszenzmikrophotographie einer Lucifer Yellow injizierten "starburst" Amakrinzelle (hell leuchtend;Pfeil) die in das Mosaik paßt, das von den Chat positiven Zellen (schwach leuchtend) gebildet wird. Es ist deutlich, daß die Lucifer Yellow gefärbte Zelle in der Rhodamin Filterkombination heller leuchtet, als die ChAT positiven Zellen, die mit Rhodamin gefärbt wurden. Diese Tatsache macht es unmöglich zu entscheiden, ob die injizierte Zelle zusätzlich mit Rhodamin gefärbt ist oder nicht (siehe Text). Skala:50µm.

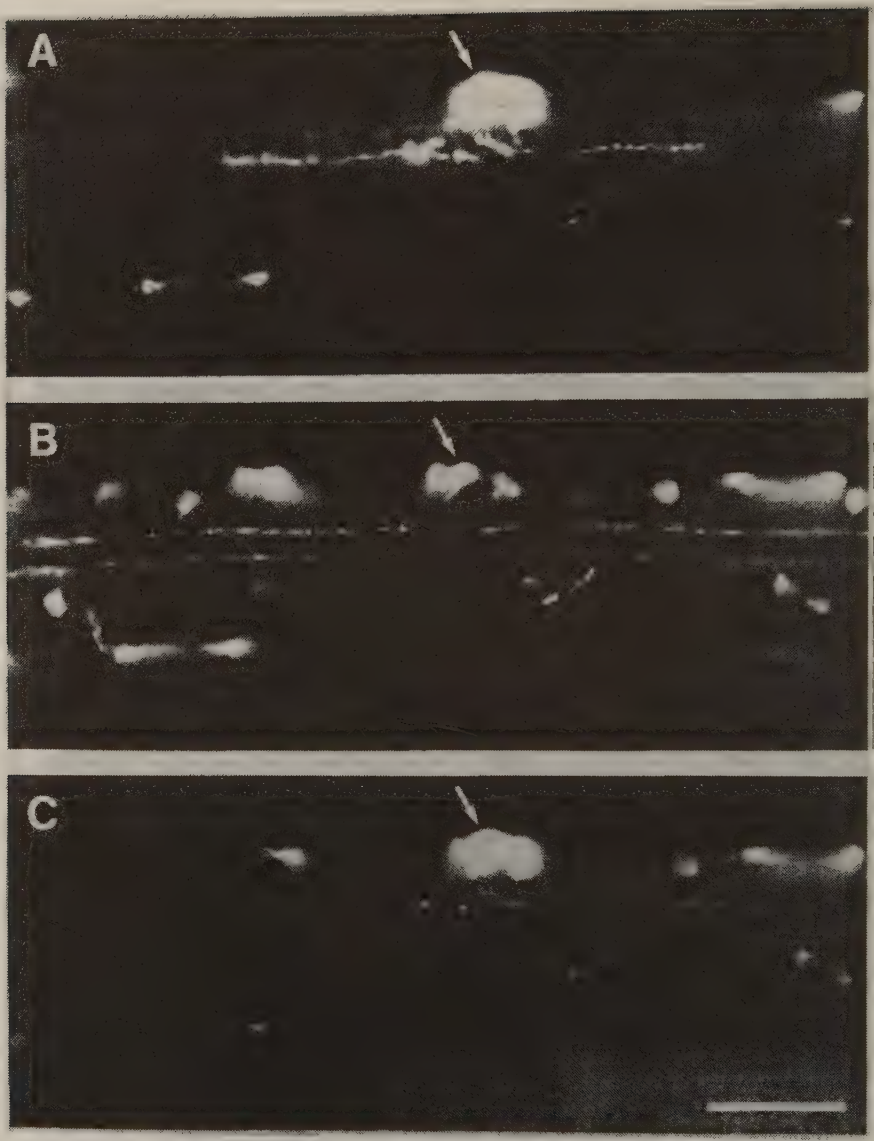

Abb.24 - A. Vertikalschnitt einer "starburst" Lucifer Yellow gefüllten Zelle, die ihren Zellkörper in der Ganglienzellschicht hat (Pfeil). Das zweite Lucifer gefüllte Soma ist der Zellkörper einer benachbarten Ganglienzelle, die bei der Suche nach der Amakrinzelle angestochen, aber nicht weiter gefüllt wurde. B. Beleuchtet man den Schnitt mit der Filterkombination für Rhodamin, so leuchten die ChAT positiven Zellen auf. Die beiden Dendritenstrata und einige cholinerge Zellkörper sind zu sehen. C. Eine Doppelbelichtung mit der Filterkombination für Lucifer Yellow und mit der Filterkombination für Rhodamin zeigt, daß die Lucifer Yellow gefüllte Zelle genau in dem Band stratifiziert, welches von den benachbarten ChAT positiven Zellen gebildet wird. Skala:50µm.

machen es ziemlich sicher, daß diese gefüllten Zellen cholinerg sind.

Analyse des Überdeckungsfaktors

Der Überdeckungsfaktor einer Zellpopulation ist die Zahl der Dendritenbäume (oder rezeptiven Felder), die sich an einem gegebenen Punkt in der Retina überlagern (Cleland et al.,'75, Peichl und Wässle, '79, Wässle et al.,'81). Wegen der großen Streuung der Dendritenbaumgrößen an einem gegebenen Punkt in der Retina (Abb.21), ist es schwierig den Überdeckungsfaktor für diese Zellpopulation zu berechnen. Um Fehler zu vermeiden, wurde die Überlappung bei einem Doppelfärbungsversuch berechnet (Abb.25). In diesem Feld wird eine Lucifer Yellow gefüllte versetzte Zelle mit ihren ChAT positiven Nachbarn gezeigt. Dendritenbaumgröße und Zelldichte stammen somit von dem selben retinalen Ort. Der relativ kleine Dendritenbaum (Durchmesser = 204µm; Feldgröße = 32600µm²) und eine Zelldichte von 630 ChAT positiven Zellen/mm² in der Ganglienzellschicht zeigen, daß diese Zelle aus einem Bereich nahe der area centralis stammt. Unter der Annahme, daß die umgebenden Zellen den gleichen Dendritenbaumdurchmesser haben, ergibt sich für dieses spezielle Feld ein Überdeckungsfaktor von 20,5. In der äußeren Peripherie der Retina hatte die größte gefüllte Zelle einen Dendritenbaumdurchmesser von 300µm (Abb.21). Multipliziert man dieses mit der niedrigsten Dichte, die man bei dieser Exzentrizität messen kann (Abb.13, 300 Zellen/mm²) so ergibt sich ein Überdeckungsfaktor von 20,9. Das bedeutet, daß die Dendritenbaumüberlagerung über die gesamte Retina hinweg konstant ist. Man muß bei diesem für die periphere Retina abgeschätzten Überdeckungsfaktor aber berücksichtigen, daß er weniger genau ist, da Zelldichte und Zellgröße aus verschiedenen Retinae kamen. Die Werte wurden nur nach dem Kriterium von niedrigster Zelldichte und größtem Dendritenbaumdurchmesser ausgesucht. Näher am blinden Fleck wurden ebenfalls große Zellen gefüllt (Abb.21). Eine solche Zelle zusammen mit einer mittleren Zelldichte von 520 Zellen/mm² (aus Abb.12, Feld C) würde einen Überdeckungsfaktor von 36 ergeben.

Dichte der cholinergen Innervation

Eine Möglichkeit, die Dichte der cholinergen Innervation abzuschätzen, besteht darin, die Gesamtdendritenlänge aller cholinergen Zellen in einem gegebenen Feld zu berechnen. Die kleinste injizierte Zelle hatte eine Gesamtdendritenlänge von 2983µm. Die größte Zelle hatte eine Dendritenlänge von 5078µm. Das ist eine Änderung um den Faktor 1,7 und damit mit der Änderung im Dendritenbaumdurchmesser vergleichbar. In einem Feld, wie dem in Abbildung 25, liegen pro Quadratmillimeter 2,3 Meter cholinerger Dendriten in jedem der beiden Plexi vor (Gesamtdendritenlänge der Zelle 3645µm, Zelldichte 630 Zellen/mm²). Das Muster zu dem diese Dendriten "verwoben" sind wird in Abbildung 17 gezeigt.

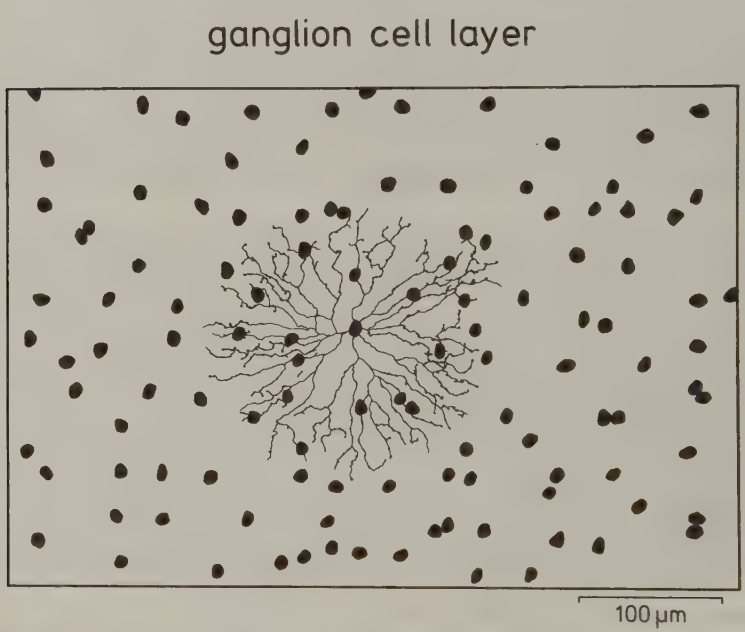

Abb.25 - Zeichnung einer Lucifer Yellow gefüllten "starburst" Zelle und den umliegenden ChAT positiven Amakrinzellen. Im Dendritenfeld dieser einen Zelle liegen viele andere Zellkörper von cholinergen Amakrinzellen. Wären deren Dendriten auch gefüllt, so käme der enorme Überlappungsgrad dieser Zellen zum Vorschein. Es ist auch zu sehen, daß diese Lucifer Yellow gefüllte Zelle genau in das Mosaik der cholinergen Zellen "paßt". Wäre sie nicht cholinerg, hätte man eine Fehlstelle im Mosaik.

III.4. DISKUSSION

ChAT positive Zellen in der Rattenretina

Der monoklonale Antikörper gegen Acetylcholintransferase färbt bei pigmentierten Ratten und Albinoratten zwei Arten von Zellen. Die eine Population hat den Zellkörper in der Amakrinzellschicht und die Dendriten verzweigen sich im äußeren Drittel der inneren plexiformen Schicht. Die andere Population hat den Zellkörper in der Ganglienzellschicht und Dendriten, die in dem mittleren Teil der inneren plexiformen Schicht stratifizieren (Abb.9 und 10). Die mit ChAT-Antikörper gefärbten retinalen Totalpräparate zeigen die Verteilung beider Zellpopulationen (Abb.11). In dem klassischen Schema der Vertebratenretina hatte man angenommen, daß Ganglienzellen die einzigen Nervenzellen in der Ganglienzellschicht seien. Erst in den letzten Jahren zeigt es sich, daß versetzte Amakrinzellen zum normalen Erscheinungsbild der Säugetierretina gehören. Sie machen ungefähr 40-55% aller Neurone in der Ganglienzellschicht der Rattenretina aus (Hughes,'77; Perry,'81), 34% in der Kaninchenretina (Vaney,'80; Hughes und Vaney,'80; Vaney et al.,'81) und ungefähr 80% in der Katzenretina (Hughes und Wieniawa-Narkiewicz,'80; Hughes,'81). Bei der Ratte überleben ChAT positive Zellen eine Durchtrennung des optischen Nerven und die anschließende Degeneration der Ganglienzellen (Abb.18). Das zeigt, daß die cholinergen Neurone in der Ganglienzellschicht der Ratte kein Axon in den optischen Nerv senden und somit Amakrinzellen sind.

In der Katzen- und in der Kaninchenretina enden die verschiedenen Typen von Bipolarzellen in verschiedenen Ebenen der inneren plexiformen Schicht (Famiglietti und Kolb,'76; Bloomfield und Miller,'81). Wenn die gleiche Einteilung für die Ratte gilt, und man eine Unterteilung der inneren plexiformen Schicht in drei Teile zugrunde legt, ein äußeres Drittel für den Eingang der Off-Bipolarzellen, ein zentrales Drittel für den Eingang der On-Bipolarzellen und ein inneres Drittel für den Eingang der Stäbchenbipolarzellen, dann stratifizieren die cholinergen Neurone

im On- (Ganglienzellpopulation) bzw. Off-Stratum (Amakrinzellpopulation). Das Stratum der Stübchenbipolarzellen hätte keinen cholinergen Plexus (Abb.10).

Die beiden ChAT positiven Zelltypen der Ratte bilden offensichtlich ein cholinerges Gesamtsystem. Beide Populationen haben am gleichen Ort, abgesehen von statistischen Schwankungen, übereinstimmende Zelldichten (Abb.11,14). Die Dichte nimmt in beiden Populationen von der Peripherie zum Zentrum hin zu (Abb.13). Summiert man die Zelldichte über die gesamte Retina, so erhält man für beide Populationen die gleiche Zellzahl. Messungen der Zellkörperdurchmesser zeigen, daß beide Zelltypen den selben Bereich an Somadurchmessern überdecken. Der Mittelwert ihrer Durchmesser unterscheidet sich nur unsignifikant um 0,3µm (Abb.22). Eine "Nächster-Nachbar-Analyse", mit der die Regelmäßigkeit und die Uniformität einer Zellpopulation überprüft wird, (Wässle und Riemann,'78) bestätigt, daß die versetzten und normalen Zellen unabhängige und in sich einheitliche Untersysteme sind, ähnlich wie die On- und Off-Ganglienzellen (Abb.15). Die Tatsache, daß die deplazierte Form weniger regulär als die nicht deplazierte Form ist, ist in Übereinstimmung mit anderen Zellpopulationen. Diese geringere Regularität wird hauptsächlich durch Blutgefäße und optische Nervenfasern verursacht, die durch Verschiebung von Zellen während der Entwicklung das Muster in der Ganglienzellschicht stören.

Intrazelluläre Injektion von Lucifer Yellow

Injiziert man retinale Neurone intrazellulär mit Lucifer Yellow, so findet man zwei Unterformen eines Amakrinzelltypes mit einem sehr charakteristischen dendritischen Verzweigungsmuster (Abb. 19,20). Diese Zellen haben die gleiche Morphologie wie die "type (a) narrow-field unistratified cells", die von Perry und Walker ('80) aus Golgimaterial beschrieben wurden. Überraschender ist, daß diese Zellen genauso aussehen, wie die cholinergen ("starburst") Zellen, die man von der Kaninchenretina her kennt (Famiglietti,'83,'85; Tauchi und Masland,'84; Vaney,'84).

Bei einem Vergleich zwischen den Lucifer-Yellow-Zellen und den ChAT positiven Zellen zeigen sich identische Zellkörperdurchmesser (Abb.22), eine identische Form des Zellkörpers mit einem exzentrisch sitzenden Kern, und eine gleiche Anzahl an primären Dendriten, die mit oder ohne Stiel vorkommen (Abb.16 A,E; 20 A-H). Diese Zellen passen in das Mosaik der ChAT positiven Zellen (Abb.23, 25) und ihre Dendriten stratifizieren innerhalb des dünnen Stratums, das von benachbarten cholinergen Zellen gebildet wird (Abb.24). Alle diese Evidenzen und die große Ähnlichkeit mit dem cholinergen System des Kaninchens (siehe unten) machen es sehr wahrscheinlich, daß diese "starburst-like" Amakrinzellen die cholinergen Amakrinzellen der Rattenretina sind.

Leider läßt sich Lucifer Yellow und Immunoreaktivität in ein und derselben Zelle nicht überzeugend darstellen (Kolokalisation). Offensichtlich verhindert eine Unverträglichkeit beider Methoden diesen direkten Beweis (siehe auch O'Shea und Bishop,'82). Dafür gibt es mehrere Erklärungen. Da Lucifer Yellow kovalent an Proteine bindet (Stewart,'81), ist es möglich, daß der monoklonale Antikörper gegen Acetylcholintransferase nicht mehr fähig ist, das Antigen zu erkennen, wenn große Menge des Farbstoffes an das Antigen binden. Andererseits kann im Falle der Peroxidase-anti-Peroxidase Methode das Lucifer Yellow möglicherweise das Enzym blockieren, und so die Bildung von genügend Reaktionsprodukt verhindern. Eine Kombination mit einem Rhodamin gekoppelten Antikörper löst das Problem ebenfalls nicht. Die helle Lucifer Yellow Fluoreszenz verhindert,daß man die schwache Rhodaminfluoreszenz der ChAT Reaktion nachweisen kann. Mit beiden Kombinationen ist eine definitive Entscheidung über eine Doppelfärbung nicht möglich.

Vergleich zwischen Ganglienzelldichte und Dichte der cholinergen Zellen

Nach einer Arbeit von Fukuda ('77) nimmt die Ganglienzelldichte in der Rattenretina von 6400 Zellen/mm² in der area centralis auf 1300 Zellen/mm² in der Peripherie hin ab. Wie hier gezeigt wurde,

sinkt die Dichte der cholinergen Zellen von 1300 Zellen/mm² auf 600 Zellen/mm². Fukuda zählte in seinen Messungen alle Zellkörper über 6µm Durchmesser als Ganglienzellen. Da die ChAT positiven Zellen einen Zellkörperdurchmesser von 8-11µm haben, ist es sehr wahrscheinlich, daß er die cholinergen Amakrinzellen der Ganglienzellschicht in seine Ganglienzellzählungen mit einbezogen hat. Wenn man dieses berücksichtigt, dann ändert sich die Ganglienzelldichte um einen Faktor von 5,8 vom Zentrum zur Peripherie, wogegen sich die Zelldichte der ChAT positiven Zellen nur um den Faktor 2,2 ändert. In der zentralen Retina kommen 4,4 Ganglienzellen auf eine cholinerge Amakrinzelle, in der Peripherie dagegen 1,7. Das könnte bedeuten, daß entweder die cholinerge Innervation der Ganglienzellen vom Zentrum zur Peripherie hin zunimmt, oder daß die cholinergen Zellen nur zu einem speziellen Typus von Ganglienzellen in Beziehung stehen, der möglicherweise einen anderen Abfall in der Zelldichte hat, als die Gesamtheit der Ganglienzellen.

Vergleich zwischen den cholinergen Systen von Ratten und Kaninchen

Ein Vergleich des cholinergen Amakrinzellsystems von Ratte und Kaninchen enthüllt verblüffende Ähnlichkeiten. Auch im Kaninchen haben diese Zellen einen kleinen runden Zellkörper und einen "starburst-like" Dendritenbaum. Diese Zellen kommen mit und ohne Stiel vor und die Anzahl der Primärdendriten schwankt zwischen drei und sieben (Famiglietti,'83,'85; Tauchi und Masland,'84; Vaney,'84). Wenn man im Kaninchen mehrere benachbarte cholinerge Zellen mit Lucifer Yellow injiziert (Tauchi und Masland,'85), erhält man ein Netzwerk von Dendriten, das identisch zu dem ChAT-positiven Netzwerk der Rattenretina ist (Abb. 17). Die "coronate" Form der cholinergen Zellkerne im Kaninchen (Hughes und Vaney,'80; Vaney,'84) ist auch den cholinergen Rattenzellen zu eigen (Abb.16). In beiden Tierarten gibt es zwei Unterpopulationen, die einmal in der Amakrinzellschicht und einmal in der Ganglienzellschicht liegen (Vaney et al.,'81). In einem eleganten Experiment konnte beim Kaninchen gezeigt werden, daß die Population in der Ganglienzellschicht Acetylcholin bei "Licht an" ausschüttet und die der Amakrinzellschicht bei "Licht aus"

(Masland et al.,'84a). Da die Stratifizierung der Zellen bei beiden Tieren ähnlich ist, ist es sehr wahrscheinlich, daß diese ON-OFF Unterteilung auch bei der Ratte vorliegt. Die Regularität beider Unterpopulationen, ausgedrückt als Verhältnis von Mittelwert (x) zu Standardabweichung (s) ist beim Kaninchen etwas höher (GCL: x/s=3,3; IPL: x/s=4,4) als bei der Ratte (GCL: x/s=2,8; IPL: x/s=4,4). Bei beiden Tieren ist die Population der Ganglienzellschicht durch das Vorkommen vermehrter Zellpaare weniger regulär, als die Population in der Amakrinzellschicht. Der mittlere Somadurchmesser der Population in der Amakrinzellschicht ist in beiden Spezies identisch (x=9,4µm). In der Ganglienzellschicht haben die cholinergen Zellen des Kaninchens einen etwas größeren mittleren Durchmesser (x=10,8µm) als die der Ratte (x=9,1µm).

Vergleicht man das cholinerge System quantitativ, so muß man berücksichtigen, daß das Kaninchenauge ungefähr fünfmal so groß ist wie das Rattenauge. In der Ganglienzellschicht des Kaninchens gibt es etwa 122400 cholinerge Amakrinzellen (Hughes und Vaney,'80, Vaney et al.,'81), in der Rattenretina 31000 cholinerge Zellen. Daraus folgt, daß die cholinerge Zelldichte in der Ratte höher ist. Die Rattenretina ist somit dem zentralen Teil der Kaninchenretina vergleichbar. Ihr fehlt der Anteil an peripherer Retina mit geringer Zelldichte, der beim Kaninchen einen großen Teil ausmacht.

Ein Vergleich der Dendritenbaumdurchmesser und der Zelldichten unterstützt dieses Argument. Der Durchmesser der cholinergen Rattenzellen reicht von 160µm bis 300µm, was einen 1,9 fachen Anstieg bedeutet. Im Kaninchen reichen die Durchmesser von 230µm bis 800µm (Tauchi und Masland,'84), was einen Anstieg um mehr als 3,5 fach bedeutet. Berechnet man die Regressionsgerade für den Anstieg als Funktion der Distanz auf der Retina (bei der Ratte über 3mm: Abb. 21; und beim Kaninchen über 12mm: siehe Abb.8 von Tauchi und Masland,'84), so erhält man in beiden Fällen eine Steigung von 47. Dieses zeigt, daß der relative Anstieg der Dendritenbaumgröße als Funktion der Distanz auf der Retina, in beiden Tierarten gleich ist. In der Ratte sinkt die Zelldichte der cholinergen Zellen von 700 auf 300 Zellen/mm² (Abb.13). Dieses ist vergleichbar mit dem Bereich

nahe dem "Streak" beim Kaninchen (siehe Abb. 14 von Masland et al.,'84b), wo die cholinerge Zelldichte über die selbe Strecke von 4mm von 800 auf 300 Zellen/mm² absinkt. Somit ist vom anatomischen Standpunkt das cholinerge System der Ratte sehr ähnlich dem zentralen Teil der Kaninchenretina. Da aber, bedingt durch die verschiedenen Augengrößen, die Vergrößerungsfaktoren in beiden Tieren verschieden sind, ergeben sich verschiedene Bedingungen, wenn man die Werte auf den Sehwinkel bezieht.

Ähnlich wie im Kaninchen nimmt die Dichte der cholinergen Zellen bei der Ratte zur Peripherie hin weniger stark ab, als die Dichte der Ganglienzellen. Beim Kaninchen gibt es im Bereich des "Streak" 3,1 Ganglienzellen für jede cholinerge Zelle und in der Peripherie 1,2 (berechnet von Vaney et al.,'81). Im Vergleich dazu findet man bei der Ratte im Zentrum 4,4 Ganglienzellen für jede cholinerge Zelle und 1,7 in der Peripherie. Die relative Änderung des Verhältnisses von Ganglienzellen zu cholinergen Zellen ist bei beiden Tierarten ungefähr 2,6 vom Zentrum zur Peripherie.

In der zentralen Retina des Kaninchens beträgt die Dendritenlänge pro Quadratmillimeter der cholinergen Amakrinzellen 1,8 bis 4,8 m/mm² (Tauchi und Masland,'84). Dieses stimmt gut mit dem in der Ratte gefundenen Wert von 2,3m Dendritenmaterial pro Quadratmillimeter überein.

Die Ähnlichkeit des cholinergen Systems bei beiden Tieren zeigt, daß eine spezielle physiologische Aufgabe offensichtlich eine spezielle Zellmorphologie, Zellverteilung, Stratifikationsebene und Benutzung des gleichen Transmitters impliziert. Es ist nun eine interessante Frage, ob das cholinerge System nur bei der Ratte und beim Kaninchen so ähnlich ist, oder ob die Charakteristika, die bei diesen beiden Tierarten gefunden wurden, typisch für alle Vertebraten sind. Von der immunohistochemischen Seite scheint die Katze sehr gut mit den anderen beiden Spezies übereinzustimmen (Schmidt et al.'85). Auch bei der Katze bestehen die cholinergen Zellen aus zwei Unterpopulationen, die in der Ganglienzellschicht und in der Amakrinzellschicht liegen und ähnliche morphologische

Eigenheiten wie bei der Ratte und dem Kaninchen aufweisen. Beim Goldfisch (Tumosa et al.,'84), beim Huhn (Baughman und Bader,'77) und beim Frosch (Eckenstein et al.,'81) haben die cholinergen Zellen ebenfalls ähnliche Stratifizierungsebenen. Dies unterstützt die Hypothese einer Uniformität dieses Transmittersystems innerhalb der Vertebraten.

IV. DOPAMIN IN DER KATZEN- UND IN DER RATTENRETINA

IV.1. EINLEITUNG

Dopamin ist, neben den inhibitorischen Aminosäuren GABA und Glycin, einer der am längsten bekannten Neurotransmitter in der Vertebratenretina (Ehinger und Falck,'71). Mit Hilfe der Histofluoreszensmethode, wie auch mit der sehr viel empfindlicheren Antikörpermethode, sind dopaminerge Zellen in den verschiedensten Tierarten beschrieben worden (zur Übersicht siehe Ehinger,'76; Brecha,'83). In Totalpräparaten der Katzenretina fanden Törk und Stone (1979) mit der Histofluoreszensmethode, daß große Amakrinzellkörper an der Grenze zwischen innerer plexiformer und innerer nukleärer Schicht mit ihren Dendriten einen Plexus mit charakteristischen Ringen ausbilden. Da der Ringdurchmesser mit etwa 9,7µm dem Zellkörperdurchmesser vieler Amakrinzellen entspricht, lag die Vermutung nahe, daß diese Dendritenringe um die Zellkörper von bestimmten Amakrinzellen gebildet werden.

In der Katzenretina sind die Stäbchenbipolarzellen nicht wie die Zapfenbipolarzellen direkt mit den Ganglionzelldendriten verschaltet. Alle Stäbchenbipolarzellen machen ihren synaptischen Kontakt auf einen Amakrinzelltyp, der dann die Information auf die On- und die Off-Ganglionzellen verteilt (Kolb und Famiglietti, '74, '76; Famiglietti und Kolb, '75; Kolb,'79). Dieses, als Amakrinzelle des Types II (abgekürzt AII) bezeichnete Neuron, nimmt somit eine Schlüsselposition innerhalb des Stäbchensytemes ein. Die AII Zelle hat einen diffusen, dicht verzweigten Dendritenbaum und besitzt an den somanahen Dendriten kölbchenförmige Verdickungen (Famiglietti und Kolb,'75). Ein zusätzliches Charakteristikum dieser vermutlich mit Glycin als Transmitter arbeitenden Zelle (Pourcho und Goebel,'85) ist ihr halb in die innere plexiforme Schicht ragender Zellkörper (Kolb,'79). In der Rattenretina sind identische Zellen aus Golgipräparaten beschrieben (Perry, '80). Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Dopamin ließen vermuten, daß die AII Zelle zu den Neuronen gehört, die von den dopaminergen Fasern innerviert werden (Pourcho,'82).

Dieser Teil der Arbeit untersucht auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene das dopaminerge System in der Katzen- und in der Rattenretina. Durch die Kombination der intrazellulären Injektionstechnik mit der Tyrosinhydroxylase Imunhistochemie soll gezeigt werden daß die AII Amakrinzellen in der Tat eine dopaminerge Innervation erhalten.

IV.2. METHODE

Immunhistochemie

Zur Markierung der dopaminergen Neurone wurde der im Kaninchen erzeugte Antikörper gegen Tyrosinhydroxylase (TH) (Eugen Teck) in Verdünnungen 1:120 verwendet. Tyrosinhydroxylase spielt bei der Synthese von DOPA, einer Vorstufe des Dopamins eine Rolle. Die Verdünnungslösung enthielt 10% normales Schaf Serum, 2% Rind-Serum-Albumin, 5% Saccharose, 0,5% Triton X-100 in 0,1M Phosphatpuffer (pH 7,4; PB). Die Retinae wurden nach einer Fixation mit 4% Paraformaldehyd in 30% Saccharose infiltriert und bei -70°C in flüssigem Stickstoff schockartig gefroren. Nach einer kurzen Zwischenwässerung erfolgte die Inkubation im ersten Antikörper für 38 Stunden bei 4°C. Anschließend folgte jeweils für eine Stunde eine Inkubation in einem Schaf-anti-Kaninchen Antikörper (1:50 in 1% normales Schaf Serum in PB) und in einem Kaninchen-Peroxidase-anti-Peroxidase Antikörper (PAP, 1:100, Medium wie beim zweiten Antikörper). Die anschließend durchgeführte Peroxidase-reaktion mit Diaminobenzidin (DAB) erfolgte gemäß den bei den cholinergen Amakrinzellen beschriebenen Schritten. In einigen Fällen wurde anstelle der PAP Reaktion ein Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelter zweiter Antikörper in der Konzentration 1:50 verwendet (Medium wie oben). Alle zweiten und dritten Antikörper stammten von der Firma Paesel (Frankfurt).

Bei dem für die Elektronenmikroskopie bestimmten Material wurde dem Inkubationsmedium kein Triton X-100 zugesetzt. Zur Verbesserung der Färbung wurde die Inkubation mit dem zweiten und dritten Antikörper zweimal nacheinander wiederholt, bevor der Nachweisschritt mit DAB erfolgte.

Fluoreszenzinduzierte Färbung und intrazelluläre Injektion von Lucifer Yellow

Der fluoreszenzinduzierte Nachweis für Katecholamine erfolgte durch die Immersionsfixierung der Retinae in 4% Paraformaldehyd,

0,5% Glutaraldehyd in 0,1M Phosphatpuffer (pH=7,4) für 1-3 Stunden (Furness et al.,'70). Die Retinae wurden anschließend in Glycerin eingedeckt und ausgewertet.

Für die intrazelluläre Injektion von Lucifer Yellow in dopaminerge Zellen, die durch die induzierte Fluoreszenz markiert waren, wurden die Retinae in 2,5% Paraformaldehyd, 0,2% Glutaraldehyd in 0,1M Phosphatpuffer für 1,5 Stunden fixiert.

Die intrazelluläre Injektionen von Lucifer Yellow in AII Amakrinzellen erfolgte ohne Vormarkierung. Die Retina der Katze wurde dafür mit 4% Paraformaldehyd für 1,5 Stunden immersionsfixiert. Bei der Ratte war eine Fixationszeit von einer Stunde mit 2% Paraformaldehyd optimal. Im einzelnen erfolgte die intrazelluläre Injektion wie im vorherigen Abschnitt beschrieben.

Umwandlung des Lucifer Yellows und Elektronenmikroskopie

Sollte an den injizierten Zellen Elektronenmikroskopie betrieben werden, so wurde die Retina mit 4% Paraformaldehyd immersionsfixiert. Die AII Amakrinzellen wurden anschließend ohne vorherige Markierung mit der Mikroelektrode angestochen und mit Lucifer Yellow gefüllt. Die Umwandlung des Lucifer Yellows in ein elektronendichtes Reaktionsprodukt erfolgt durch einen photooxidativen Prozeß (Maranto, '82). Das Gewebe wurde für 15 Minuten in 3,3-Diaminobenzidin (1,5mg/1ml 0,1M PB) inkubiert und einzelne injizierte Zellen in dieser Lösung unter dem Fluoreszenzmikroskop beleuchtet (UD 40X). Das elektronendichte Diaminobenzidin Reaktionsprodukt ensteht innerhalb von 10 Minuten. Die Photooxidation wurde abgebrochen wenn das Lucifer Yellow weitgehend ausgebleicht war und sich genügend Reaktionsprodukt gebildet hatte. Nach der Umwandlung wurden die Präparate kurz in Phosphatpuffer eingedeckt, anschließend wurden die Zellen gezeichnet und photographiert. Es folgte eine Nachfixierung in 2,5% Glutaraldehydlösung in 0,1M Phosphatpuffer (pH 7,4). Die Retinastücke wurden in 2% Osmiumtetroxid eine Stunde fixiert und

dann nach einer Dehydrierung in Durcupan eingebettet. Der gesamte Block wurde 5µm dick geschnitten und die Schnitte, die die Zellen enthielten, zur lichtmikroskopischen Auswertung für kurze Zeit in Durcupan eingedeckt. Nach dieser Auswertung wurden die Schnitte, die den Zellkörper enthielten mit Durcupan auf vorgeschnittene Blöcke aufgeklebt. Von diesen Schnitten wurden ultradünne Serienschnitte erstellt. Die Ultradünnschnitte wurden auf Lochfolien aufgefangen und auf einem EM 10 (Zeiss) mikroskopiert.

Wenn Immunhistochemie und intrazelluläre Füllung kombiniert wurden, erfolgte die Umwandlung des Lucifer Yellow in ein elektronendichtes Reaktionsprodukt zwischen der zweiten und dritten Antikörperinkubation. Nachfolgend wurden die Retinastücke in der oben beschriebenen Weise weiter behandelt.

IV.3. ERGEBNISSE

Tyrosinhydroxylase positive Zellen in der Katzenretina

Ein Antikörper gegen das Dopamine synthetisierende Enzym Tyrosinhydroxylase, färbt in der Katzenretina eine Population von Amakrinzellen, die ihren Zellkörper in der Amakrinzellschicht haben (Abb.26). Mit einem Zellkörperdurchmesser von 16.5µm (N=40; S.D. =2,6) gehören sie zu den größten Amakrinzellen der Retina. Ihre Dichte, zwischen 14 Zellen/mm² in der area centralis und 5 Zellen/mm² in der peripheren Retina, ist ungewöhnlich niedrig. Die mittlere Zelldichte beträgt 10 Zellen/mm². Auf die gesamte Retinafläche von 452mm² hochgerechnet gibt es im Auge der Katze c.a. 4600 dopaminerge Zellen. Die dopaminergen Zellen haben sehr lange Primärdendriten, die sich an der äußersten Kante der inneren plexiformen Schicht verzweigen. Die Primärdendriten sind in einem dichten aus hunderten von sehr feinen Fasern bestehenden Plexus eingesponnen, wobei in dem Netzwerk viele ringförmige Löcher auffallen (Abb.26A,B). In der Mitte der inneren plexiformen Schicht finden sich zusätzlich einige wenige gerade verlaufende Fasern (Abb.26C,D). Diese Fasern verlassen den Ringplexus für ein bis zwei Millimeter, dann tauchen sie wieder in den Ringplexus ein, wo man sie schließlich zwischen den anderen Fasern verliert. Bei immunohistochemischen Färbungen ist es wegen der hohen Verzweigungsdichte in den meisten Fällen unmöglich, Zellfortsätze über größere Distanzen zwischen den gefärbten Nachbarfortsätzen zu verfolgen. Deshab läßt sich am Lichtmikroskop auch nicht mit Sicherheit eine direkte Beziehung zwischen dem Ringplexus und den dicken Primärdendriten der dopaminergen Zellen herstellen.

Wie bei allen bekannten Zellpopulationen in der Retina, gibt es auch bei den Tyrosinhydroxylase positiven Zellen sogenannte Ausreißer, die ihre Zellkörper in einer von der Gesamtpopulation abweichenden Schicht haben. Bei solchen vereinzelt in der Ganglionzellschicht vorkommenden Zellen sieht man ein bis zwei lange dünne Fasern in die Mitte der inneren plexiformen Schicht ziehen, wogegen die übrigen dickeren Primärdendriten in den äußeren Ringplexus abtauchen.

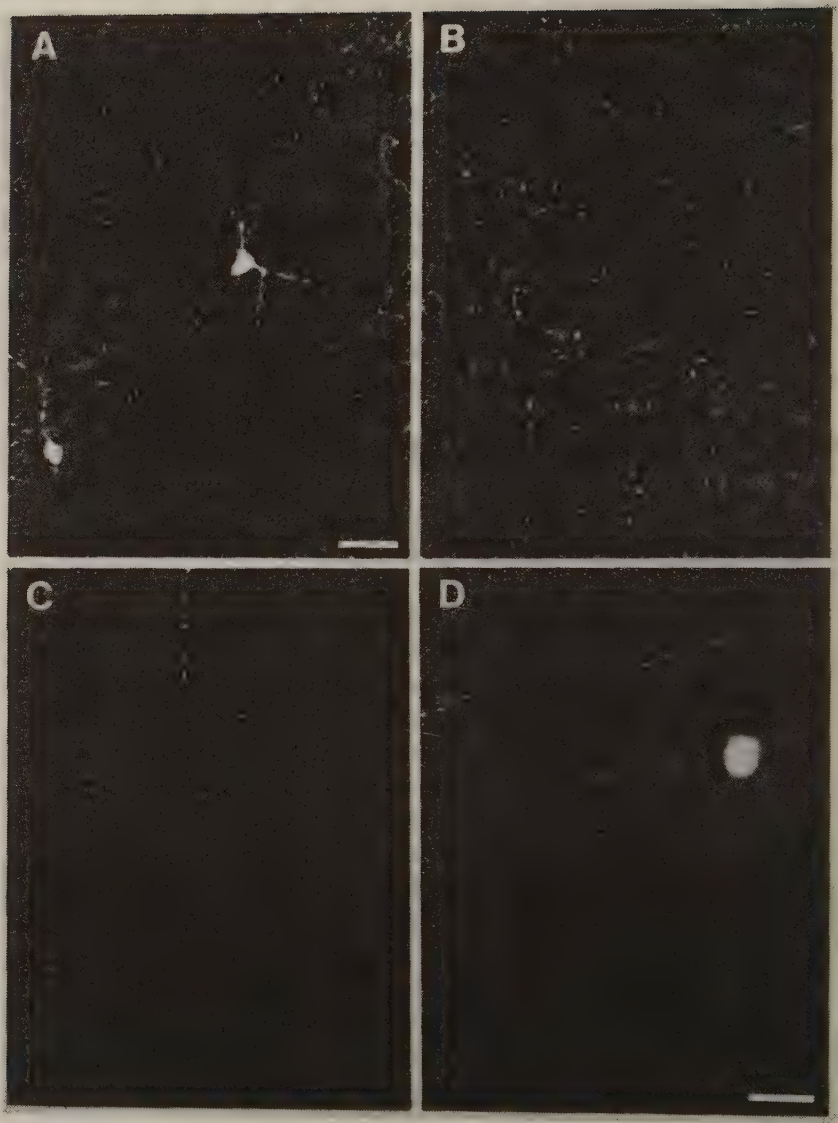

Abb.26 - Fluoreszenzmikrophotographien einer Katzenretina, die mit einem Antikörper gegen Tyrosinhydroxylase gefärbt wurde. A. Die großen Tyrosinhydroxylase positiven Zellen liegen mit ihren dicken Primärdendriten eingebettet in einen dichten Plexus, der aus sehr vielen feinen Fasern gebildet wird. Dieser Faserplexus befindet sich an der äußeren Kante der inneren plexiformen Schicht. B. In diesem Plexus befinden sich eine große Zahl gleichgroßer Löcher, die von ringförmig ausgebildeten Varikositäten umschlossen sind. C,D. In der Mitte der inneren plexiformen Schicht sieht man einzelne lange Fasern, die aus dem Ringplexus aufsteigen und über unterschiedlich lange Strecken durch die innere plexiforme Schicht ziehen, bevor sie wieder in den Ringplexus eintauchen. Skala: A=50µm; B-D=30µm.

Tyrosinhydroxylase positive Zellen in der Rattenretina

In der Rattenretina erhält man mit dem gleichen Antikörper ein sehr ähnliches Bild wie bei der Katze (Abb. 27A). Auch hier gibt es sehr große Amakrinzellen mit stark gefärbten Primärdendriten, die auf einem Plexus mit vielen ringförmigen Strukturen liegen. Der Zellkörperdurchmesser dieser Zellen beträgt bei der Ratte 12,5µm (N=40; S.D. =1,5). In zwei Retinae, bei denen jeweils 1,4 Quadratmillimeter in der mittleren Peripherie ausgezählt wurden, ergaben sich Zelldichten von 33 Zellen/mm² bzw. 38 Zellen/mm². Die Dichte dieser Zellen ist somit drei bis viermal so hoch wie bei der Katze. Legt man eine retinale Gesamtfläche von 60mm² zugrunde,

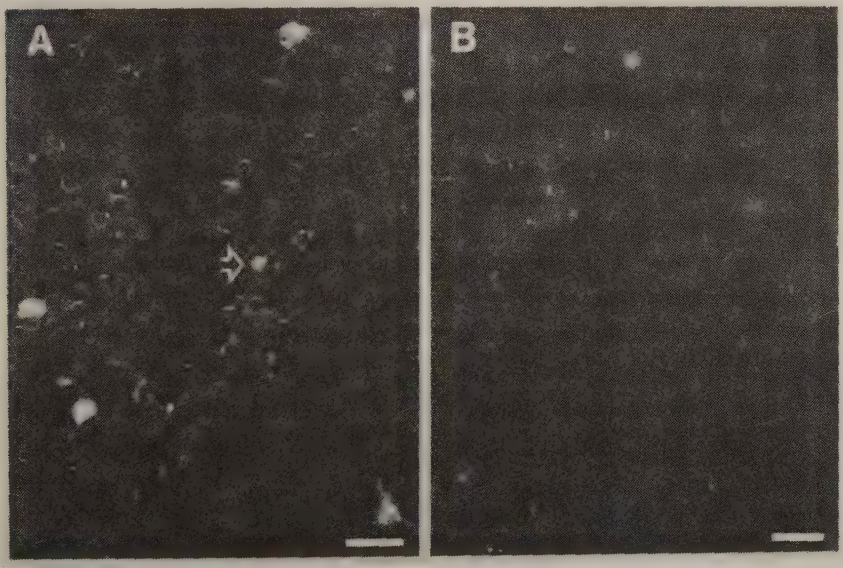

Abb.27 - A. Fluoreszenzmikrographien einer Rattenretina, die mit einem Antikörper gegen Tyrosinhydroxylase gefärbt wurde. Neben den großen Tyrosinhydroxylase positiven Zellen färbt sich ein stark ausgeprägter Ringplexus an. Neben den großen Zellkörpern gibt es noch Zellen mit kleineren Somadurchmessern (A, Pfeil) Feine Fortsätze entspringen dem Ringplexus, ziehen durch die innere nukleäre Schicht und enden in der äußeren plexiformen Schicht (B). Welcher der gefärbten Zellkörper diese Fortsätze ausbildet ist aus dem immunohistochemischen Material nicht zu entscheiden. Skala: A=30µm; B=20µm.

ergibt sich eine Gesamtzahl von etwa 2300 dopaminergen Zellen. Eindeutiger als bei der Katze, ziehen bei einigen dieser Zellen die Primärdendriten direkt vom Zellkörper in die mittlere Hälfte der inneren plexiformen Schicht und in geringer Zahl sogar bis in die Ganglienzellschicht. Bei einem Teil der Zellen stratifizieren die Primärdendriten auf dem Ringplexus, wogegen bei anderen Zellen die Dendriten direkt vom Soma aus in die Mitte der inneren plexiformen Schicht aufsteigen. Verfolgt man diese Fortsätze, so sieht man, daß sie nach einiger Zeit wieder in den äußeren Ringplexus abtauchen.

Im Vergleich zur Katze ist die Zelldichte größer und das Mosaik der Zellkörper weniger regelmäßig. Die Form der Zellkörper reicht von rund bis spindelförmig. Diese Befunde sprechen für die Existenz von zwei sehr ähnliche Zellpopulationen. Ohne eine zusätzliche Methode, mit der sich die Morphologie einzelner Zellen nachweisen läßt, ist es allerdings nicht möglich zu entscheiden, ob es sich hier um die Variationsbreite einer einheitlichen Population handelt, oder ob bei der Ratte zwei getrennte Zellarten vorliegen.

Auffällig ist darüberhinaus, daß, abweichend zur Katze, zusätzlich runde, schwach angefärbte Zellen vorkommen. Mit einem Zellkörperdurchmesser von 7,9µm (N=40; S.D.=0,8) sind diese Zellen deutlich kleiner als die großen Tyrosinhydroxylasezellen (Abb.27A). Da sich diese kleinen Zellen nur schwach anfärben, ist es sehr schwer zu entscheiden, ob es sich hier um eine homogene Klasse handelt, oder um mehrere Arten. In einem der ausgewählten Felder wurden 76 kleine Zellen/mm² gezählt. Das Verhältnis zwischen kleinen und großen Zellen beträgt somit etwa 2:1. An diesen Zellen konnte nie ein gefärbter Primärdendrit beobachtet werden.

Fokussiert man von der Amakrinzellschicht weiter in Richtung Photorezeptoren, so sieht man an vielen Stellen aus dem Ringplexus heraus feine Fortsätze in die äußere plexiforme Schicht aufsteigen. Die Zuordnung dieser interplexiformen Fortsätze zu individuellen Zellen ist ebenfalls wegen der Dichte der Verzweigungen nicht möglich (Abb.27B).

Aufbau und Struktur der Ringe

Die Durchmesser der Ringe schwanken bei der Katze zwischen 7-10µm, und entsprechen damit dem Zellkörperdurchmesser vieler Amakrinzellen. Es liegt die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um Fasern handelt, die um Zellkörper herum laufen und damit den Eindruck einer ringförmigen Struktur erzeugen. In der peripheren Retina, wo die Faserdichte stark reduziert ist, kann man die Feinstruktur der Ringe in günstigen Fällen gut erkennen (Abb.28). Mehrere Fasern laufen entweder gerade oder leicht wellenförmig zusammen, wobei die vermehrte Ausbildung von Varikositäten im Ringbereich zu dem charakteristischen Aussehen beiträgt. Die ringförmig angeordneten Varikositäten heben diese Strukturen deutlich von bloßen Löchern im Plexus ab (Abb.26A,B; Abb.27A).

Histofluoreszensfärbung und intrazellulär Injektion von Lucifer Yellow

Katecholamine haben die Eigenschaft, bei Fixierung des Gewebes mit einem Glutaraldehyd-Paraformaldehyd-Gemisch fluoreszierende Verbindungen auszubilden (Falck-Hillarp Methode). In Retinae, die so fixiert worden sind, sieht man unter dem Fluoreszenzmikroskop wenige, sehr große Amakrinzellen, deren Fortsätze auf einem von

Abb.28 - Fluoreszenzmikrophotographien von Tyrosinhydroxylase positiven Fasern in einer Rattenretina. Die geringere Faserdichte in der Peripherie der Retina enthüllt in günstigen Fällen, daß die Ringe aus mehreren Segmenten sehr dünner Fasern bestehen. Diese Fasern laufen tangential zusammen und erwecken durch vermehrte Ausbildung von Varikositäten den Eindruck einer ringförmigen Struktur. Skala=10µm.

Ringen gebildeten Plexus liegen (Törk und Stone,'79). Da Dopamin das einzige Katecholamin ist, das in der Retina in größeren Mengen vorkommt, geht man davon aus, daß es sich bei diesen Zellen um dopaminerge Neurone handelt. Mit einer solchen Histofluoreszenzfärbung erhält man eine identische, wenn auch viel schwächere Färbung, wie bei der die immunhistochemischen Methode mit dem Tyrosinhydroxylase Antikörper.

Die Histofluoreszenztechnik wurde in dieser Arbeit in einer leicht abgewandelten Form verwendet, um die Zellkörper der dopaminergen Zellen anzufärben, so daß sie anschließend unter mikroskopischer Kontrolle intrazellulär mit Lucifer Yellow gefüllt werden konnten (Abb.29). Vergleicht man solche injizierte Zellen mit besonders gut immunohistochemische gefärbten Exemplaren, so zeigen Zellkörpergröße, Zellkörperform und die Art der dendritischen Verzweigungen, daß es sich in beiden Fällen, um den gleichen Zelltyp handeln dürfte.

Durch die intrazelluräre Füllung färbt sich das primäre Dendritensystem der dopaminergen Zellen gut an. Die feinen Fortsätze, die sich bei der immunhistochemischen Färbung wegen der hohen Dichte nicht zuordnen lassen, füllen sich nicht, oder nur zu einem geringen Teil mit Lucifer Yellow. Am Ende der gefüllten Dendriten erkennt man, daß sich deren Durchmesser drastisch verkleinert, wodurch der Farbstoff nur noch über eine kurze Distanz weiter in den Fortsatz vordringen kann. Wegen dieses technischen Problems ist die wirkliche Größe dieser Zellen nicht zu ermitteln. Bei der Lucifer Yellow gefüllten Zelle die in Abbildung 29 gezeigt wird, verläßt einer der Dendriten 430µm vom Zellkörper entfernt die Hauptstratifizierungsebene und steigt in die Mitte der inneren plexiformen Schicht auf (Abb.29, Pfeil). Da sich der Durchmesser dieser Faser an dieser Stelle erheblich verdünnt, füllte sie sich nur noch über eine kurze Strecke. Nur an manchen Stellen dringt der Fluoreszensfarbstoff in die extrem dünnen und vermutlich fein verzweigten Fortsätze dieser Zellen ein. In diesen Fällen ähneln die gefüllten Dendriten den dünnen varikositätenreichen Fasern, die aus

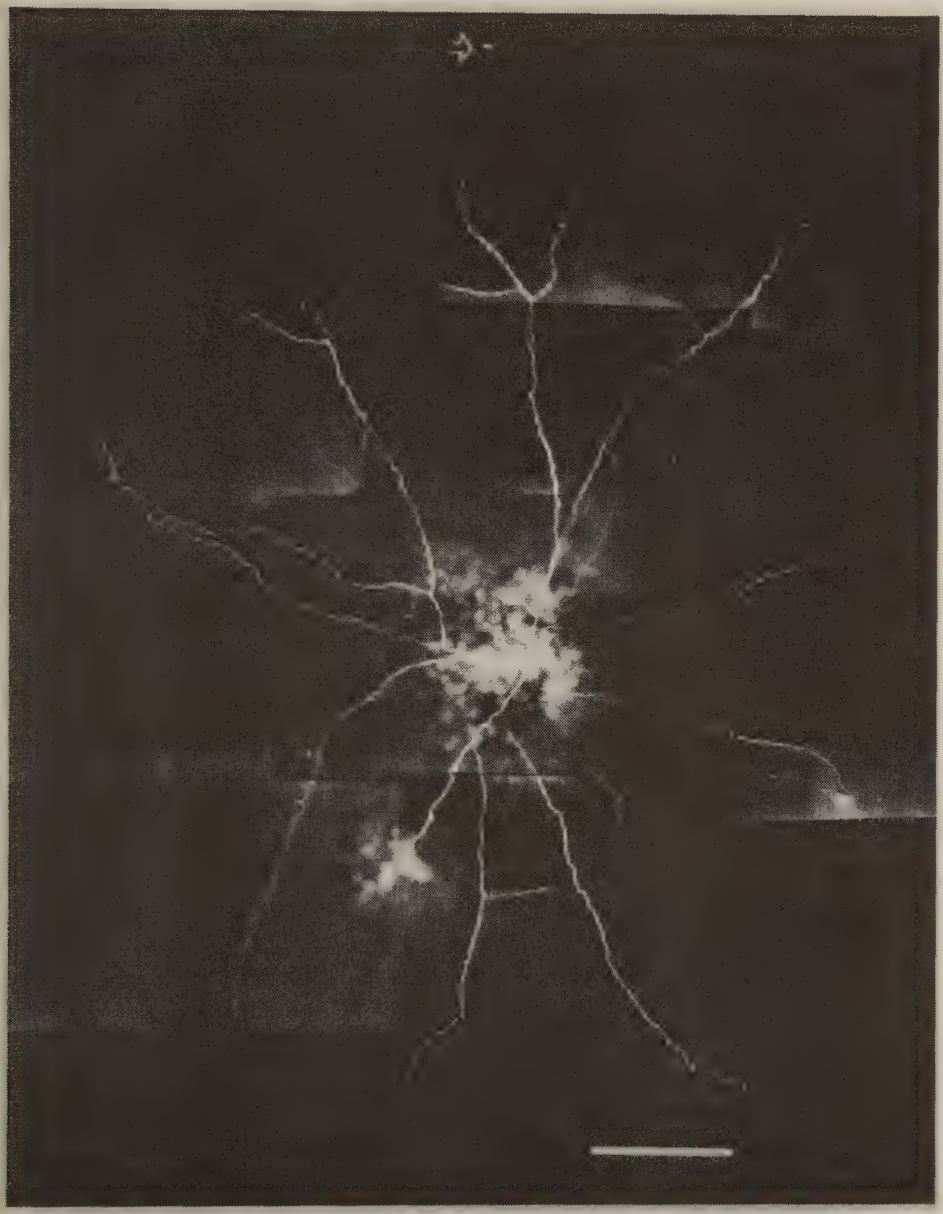

Abb.29 - Photomontage einer mit Lucifer Yellow injizierten dopaminergen Zelle aus der Katzenretina. Der offene Pfeil markiert die Stelle an der einer der Dendriten die Hauptstratifizierungsebene der Zelle verläßt und in die Mitte der inneren plexiformen Schicht zieht. Diese Zelle hat sich bis zu einem Durchmesser von 760µm gefüllt. An den Spitzen der gefüllten Dendriten erkennt man, daß sich ihr Durchmesser drastich verkleinert. Skala=100µm.

der immunohistochemischen Färbung bekannt sind (Abb.30). Bei den feinen Fortsätzen, die aus dem Bereich um das Soma der injizierten Zelle geradlinig in alle Richtungen verlaufen (Abb.29), handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein Füllungsartefakt. Die gleiche, an eine "Kernverdampfung" erinnernde Faserfärbung erhält man auch, wenn man den Farbstoff diffus in die innere plexiforme Schicht injiziert. Ohne den Zusatz von Glutaraldehyd tritt dieses Phänomen nicht auf.

In Abbildung 31 sind sieben injizierte Zellen gezeigt. Mit einem Dendritenbaumdurchmesser von 600 bis 780 µm überdeckt jede eine Fläche von etwa 0,34mm². Zum Größenvergleich ist zusätzlich eine AII Amakrinzelle abgebildet worden.

Es stellt sich nun die Frage, ob diese Lucifer injizierten dopaminergen Zellen den dichten Plexus der dopaminergen Verästelungen, wie ihn die Immunhistochemie zeigt, bilden können. Um dies nachzuprüfen, wurden alle Zellkörper der dopaminergen Amakrinzellen in einem kleinen Gebiet von 7mm² nach immunhistochemischer Färbung herausgezeichnet. Anschließend wurde an jede Zellkörperposition eine der sieben injizierten Zellen "gesetzt", wobei die Dendriten zufällig orientiert waren. Abbildung 32 zeigt die Überdeckung der Retina mit diesen Zellbildern.

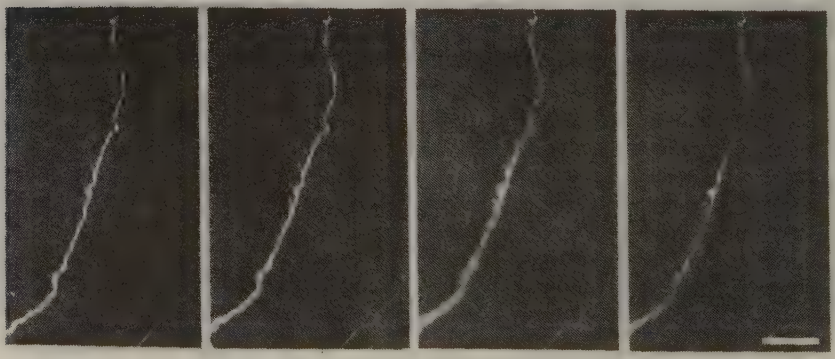

Abb.30 - Fokusserie eines sehr feinen stark verzweigten Fortsatzes, der sich über ein größeres Stück mit Lucifer Yellow gefüllt hat. Diese dünnen, stark verzweigten Fasern bilden mit großer Wahrscheinlichkeit die Ringe zwischen den Zellen aus. Skala: 30µm.

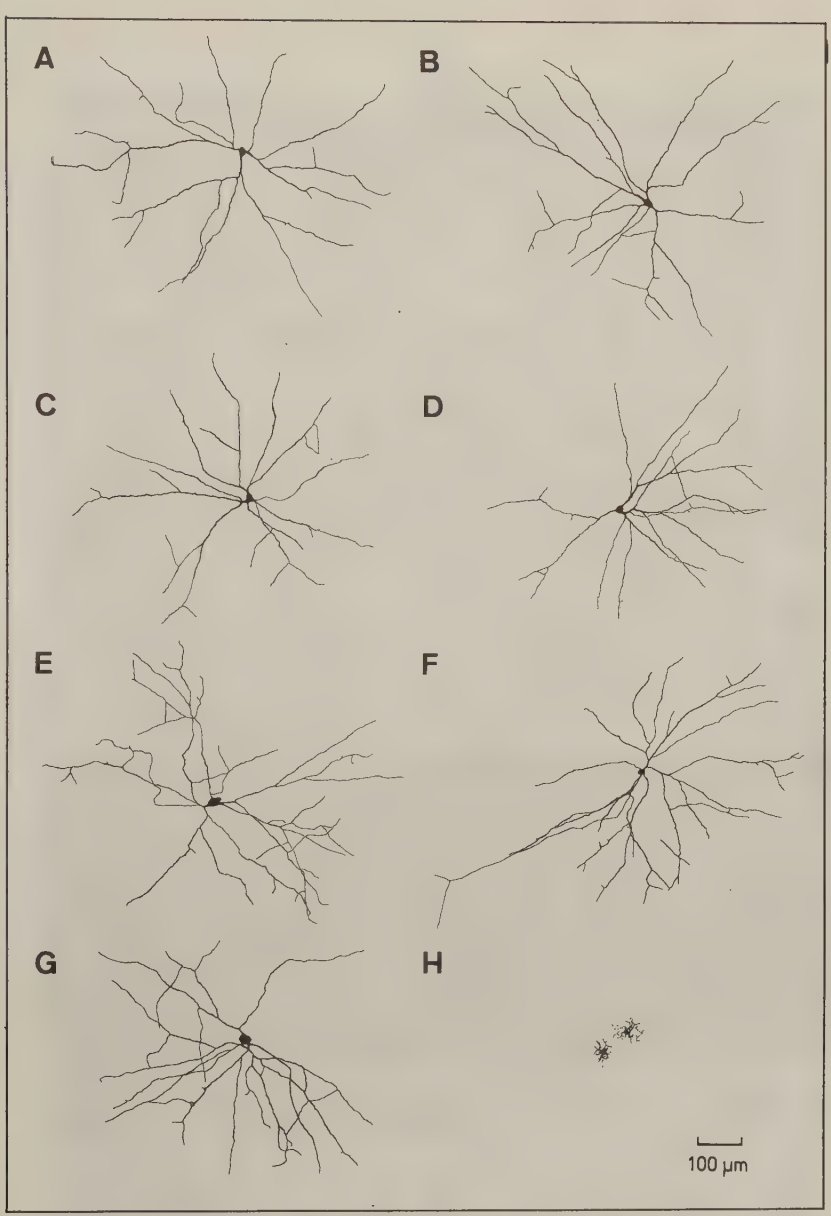

Abb.31 - A-G. Zeichnungen von sieben mit Lucifer Yellow gefüllten dopaminergen Zellen aus der Katzenretina. Aller Wahrscheinlichkeit nach hat sich nur der primäre Dendritenbaum dieser Zellen angefärbt. H. Zum Vergleich die Winzigkeit einer AII Amakrinzelle bei gleicher Vergrößerung. Sie ist eines der Zielneurone der dopaminergen Innervation.

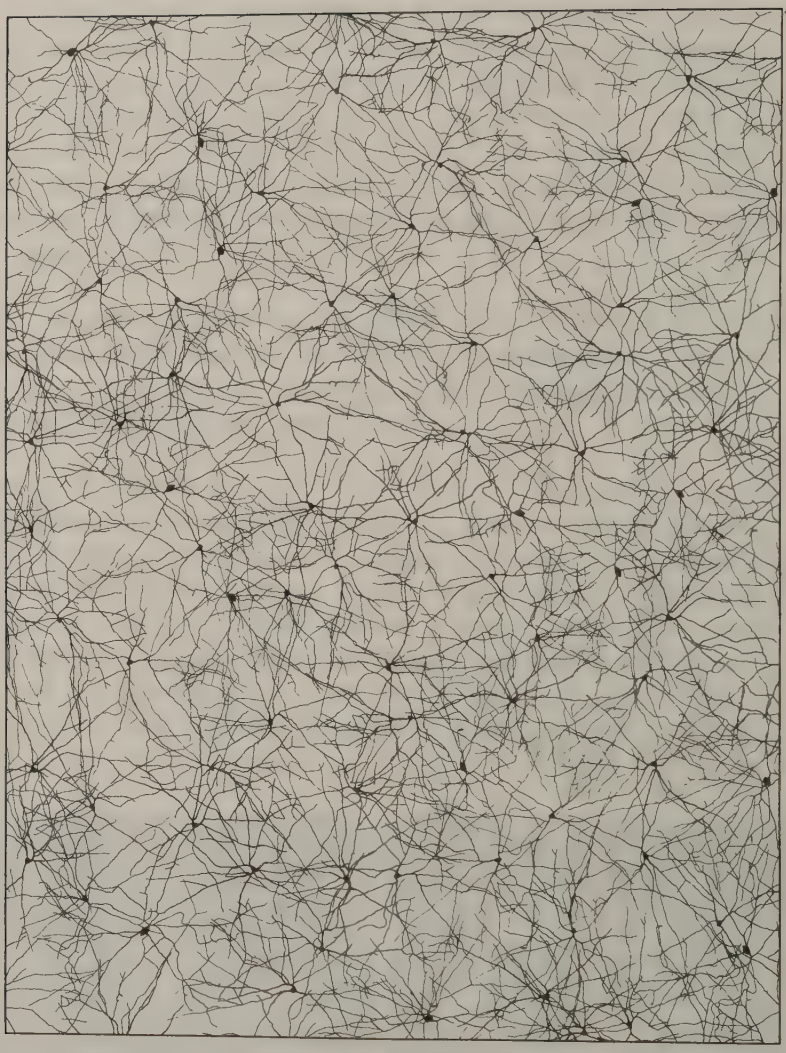

Abb.32 - Montage, bei der die sieben in Abb.31 gezeigten dopaminergen Zellen mehrere Male in eine Zellpositionskarte eingetragen wurden (Das Feld ist ein Ausschnitt von Abb.36D). Trotz der vermuteten starken Unterfärbung der Zellen, entspricht diese künstliche Karte dem Grundmuster des Dendritennetzwerkes der immunhistochemischen Färbung. Der dichte Ringplexus zwischen den Dendriten fehlt allerdings.

Berücksichtigt man, daß die Lucifer Yellow injizierten Zellen mit Sicherheit unterfärbt sind, dann stimmt dieses konstruierte Dendritennetz erstaunlich gut mit dem dichten Verzweigungsmuster der dopaminergen Zellen, wie es die Immunhistochmie zeigt, überein. Der überdeckungsfaktor ergibt, daß sich Dendriten von 3-4 Zellen an jedem Punkt überlappen.

Tyrosinhydroxylasefärbung im Vertikalschnitt

Wie schon oben angedeutet, entspricht die Ringgröße dem mittleren Durchmesser vieler Amakrinzelltypen. In retinalen Vertikalschnitten, die mit dem Antikörper gegen Tyrosinhydroxylase gefärbt worden sind, sieht man, daß der Plexus der dopaminergen Zellen an der Grenzschicht zwischen innerer nukleärer Schicht und innerer plexiformer Schicht ausgebildet ist (Abb.33). In jedem Schnitt findet man Zellen, deren Zellkörper aus der inneren nukleären Schicht herausragen (Abb.33 A,B). Seitlich werden diese Zellen regelmäßig von Tyrosinhydroxylase positiven, varikositätenreichen Fasern flankiert.

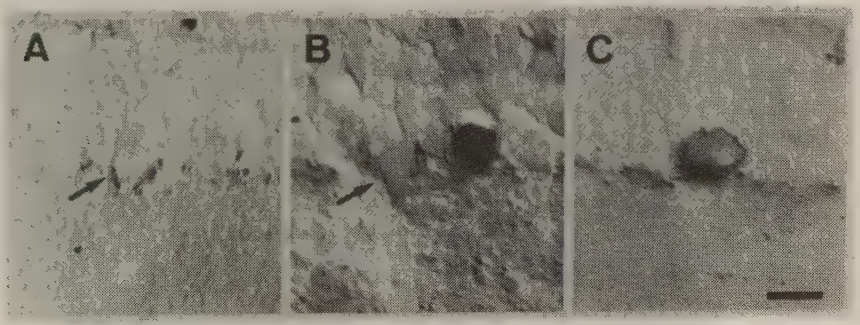

Abb.33 - Peroxidase-anti-Peroxidase gefärbte Vertikalschnitte einer Rattenretina. Die Tyrosinhydroxylase positiven Fasern verlaufen an der Grenze zwischen inner plexiformer und innerer nukleärer Schicht. A,B. Häufig sind Amakrinzellen einer bestimmten Größe zu sehen, deren Zellkörper halb aus der inneren nukleären Schicht herausragt (Pfeile). Diese Zellen sind immer von Tyrosihydroxylase positive Fasern flankiert. C. Eine angeschnittene dopaminerge Zelle. Skala: 10µm.

Identifizierung der Zellen in den Ringen

In Vertikalschnitten sind die, bei der Katze als AII Amakrinzellen bezeichneten Neurone, leicht an ihren in die innere plexiforme Schicht hineinragenden Zellkörpern zu erkennen. Abbildung 34 zeigt eine mit Lucifer Yellow gefüllte AII Amakrinzelle in einem Vertikalschnitt der Rattenretina. Deutlich sind die kölbchenförmigen Fortsätze und Teile des buschigen Dendritenbaumes sichtbar. Eine immunohistochemische Gegenfärbung solcher intrazellulär gefüllter AII Amakrinzellen zeigte in allen Fällen, daß bei beiden Tierarten diese Zellen tatsächlich innerhalb der Ringe liegen (Abb.35). Alle

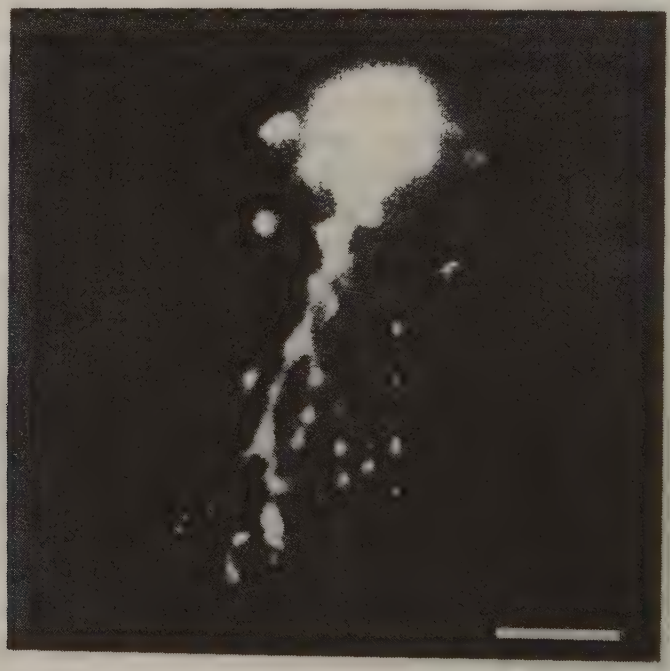

Abb.34 - Eine mit Lucifer Yellow gefüllte AII Amakrinzelle aus der Rattenretina im Vertikalschnitt. Charakteristisch sind der kleine buschige Dendritenbaum und die kölbchenförmigen Fortsätze in der Nähe des Zellkörpers, der in die innere plexiforme Schicht herausragt (Vergleiche Abb.39,40). Skala: 10µm.

anderen Amakrinzellen, die bei der Suche nach den AII Zellen gefüllt worden waren, hatten ihren Zellkörper dagegen eindeutig außerhalb des dopaminergen Plexus.

Dopaminerge Zelldichte und Ringdichte

Die Dichte der dopaminergen Zellen nimmt in der Katzenretina von 14 Zellen/mm² im Bereich der area centralis auf 5 Zellen/mm² in der Peripherie ab (Abb.36D; Abb.37B). Die Zahl der Ringe liegt um etwa das dreihundertfache höher. Sie ändert sich von 4700 Ringen/mm² im zentralen Bereich (Abb.36B; Abb.37A), auf 1200 Ringe/mm² in der Peripherie (Abb.36C; Abb.37A). Ein Vergleich mit der bekannten Dichte der AII Amakrinzelle (Abb 37A, schraffierter Bereich, entnommen aus Vaney,'85) zeigt eine gute Übereinstimmung zwischen Zelldichte und Ringdichte.

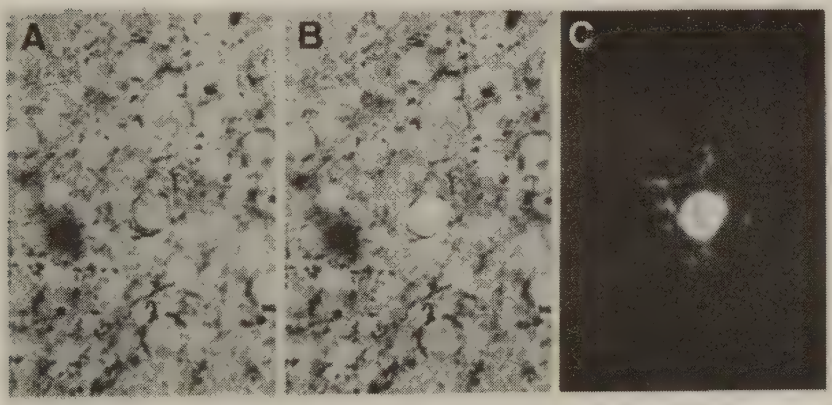

Abb.35 - Eine AII Amakrinzelle in einem mit Tyrosinhydroxylase-PAP gegengefärbten Totalpräparat der Katzenretina. A. Der dopaminerge Plexus bei Durchlichtbeleuchtung. B. Durchlicht plus Auflichtfluoreszenzbeleuchtung. C. Fluoreszensbeleuchtung allein. Die Photoserie macht deutlich, daß die AII Amakrinzelle mit ihrem Zellkörper in einem der dopaminergen Ringe sitzt. Skala: 10µm.

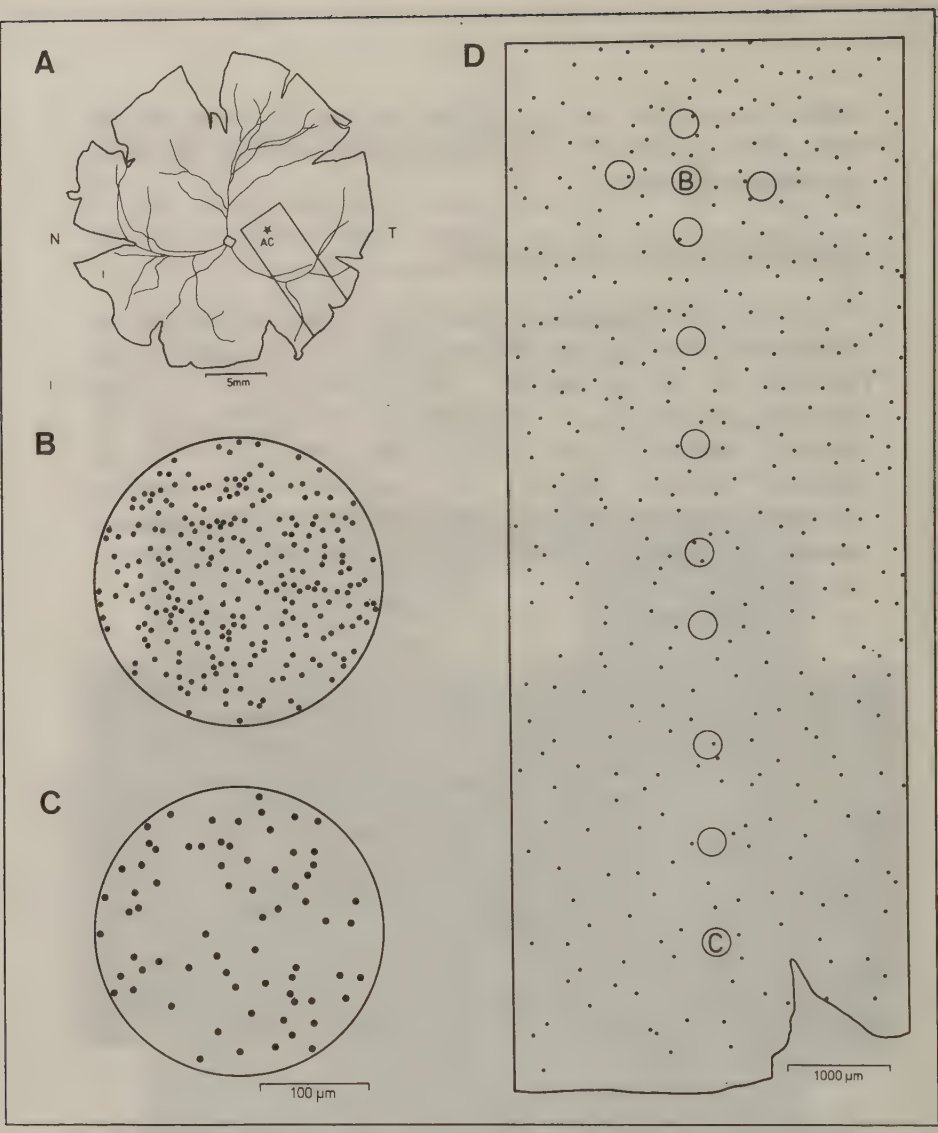

Abb.36 - Verteilung der dopaminergen Amakrinzellen in einer Katzenretina. A. Zeichnung der Umrisse und der großen Blutgefäße des retinalen Totalpräparates. Der Stern markiert die area centralis (AC). In dem rechteckigen Auschnitt wurden alle Tyrosinhydroxylase positiven Amakrinzellen gezeichnet und ihre Verteilung ist in D dargestellt. Die Kreise in D markieren die Felder, in denen die Ringe ausgezählt wurden. Zwei dieser Felder, B und C sind nochmals in größerem Maßstab gezeigt. Die Punkte in B und C markieren Größe und Position der Ringe. Man erkennt deutlich wie die Dichte der Ringe von der zentralen Retina (Feld B) zur peripheren Retina (Feld C) abnimmt.

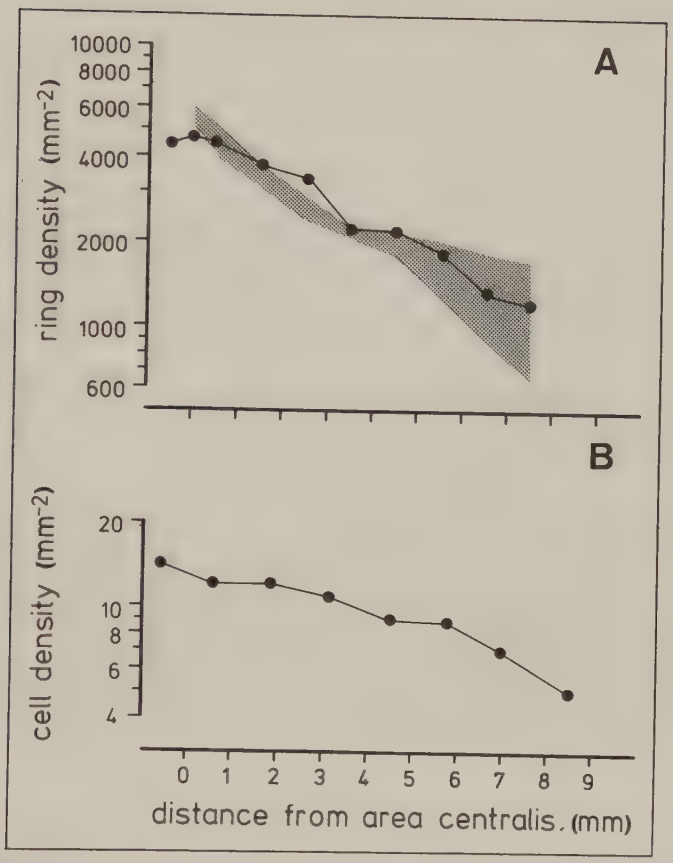

Abb.37 - Die aus Abb.36 gewonnenen Dichtewerte der dopaminergen Zellen (B) und der dopaminergen Ringe (A) in Abhängigkeit der Exzentrizität. Der schraffiert eingezeichnete Bereich stellt die AII Amakrinzelldichte dar, die aus der Arbeit von Vaney ('85) entnommen wurde.

Dopaminerge Innervation der AII Amakrinzelle

Die Frage nach der dopaminergen Innervation von AII Amakrinzellen läßt sich nur auf der elektronenmikroskopischen Ebene beantworten. Die ringförmige Anordnung der dopaminergen Innervation bei Amakrinzellen ist in Horizontalschnitten gut zu erkennen (Abb.38). In den hier gezeigten Beispielen handelt es sich vermutlich um die AII Amakrinzellen, da sie weit in den dopaminergen Plexus hineinragen. Dieses wird besonders deutlich bei leicht schräg verlaufender Schnittrichtung, bei der die AII Amakrinzelle immer die am weitesten in den Plexus vorgeschobene Zelle ist (Abb.38A). Der Zellkörper dieser Zellen ist immer von dopaminergen Fasern umringt (Abb.38B). Die horizontale Schnittrichtung zeigt darüberhinaus, daß es sich bei den Synapsen um sehr lange Spezialisierungen handelt (Abb.38C,D). In einer Schnittebene kann man bis zu vier synaptische Kontakte beobachten. Da oft mehrere Varikositäten in vertikaler Richtung übereinander liegen (Abb.33; Abb.43B) ist die Gesamtzahl der dopaminergen Synapsen an diesen Zellkörpern sicherlich höher.

Nach einem Photooxidationsprozeß des Lucifer Yellows und der Gegenfärbung mit dem Antikörper gegen Tyrosinhydroxylase, läßt sich die Innervation der zuvor lichtmikroskopisch identifizierten AII Zellen untersuchen. Abbildung 39 zeigt eine horizontale Fokusserie einer solcher AII Zelle nach der Umwandlung. Deutlich sind die kölbchenförmigen Fortsätze im Bereich des Zellkörpers und der in der inneren plexiformen Schicht stark verzweigte buschige Dendritenbaum zu erkennen. In Vertikalschnitten sieht man sowohl die exponierte Lage dieser Zelle, wie auch die dopaminergen Fasern, die um den Zellkörper dieser Zellen herumziehen (Abb.40, Abb.41).

Im Elektronenmikroskop sind die injizierten Zellen aufgrund ihrer dunkelen Markierung leicht zu erkennen (Abb.42). Die durch das Lucifer Yellow induzierte Färbung unterscheidet sich von der immunhistochemischen Markierung, obwohl das gleiche Chromogen verwendet wurde. Im Fall der immunohistochemischen Markierung ist das Reaktionsprodukt etwas körniger. Die synaptischen Kontakte, die diese Zellen mit anderen Profilen macht sind gut zu erkennen (Abb 42C).

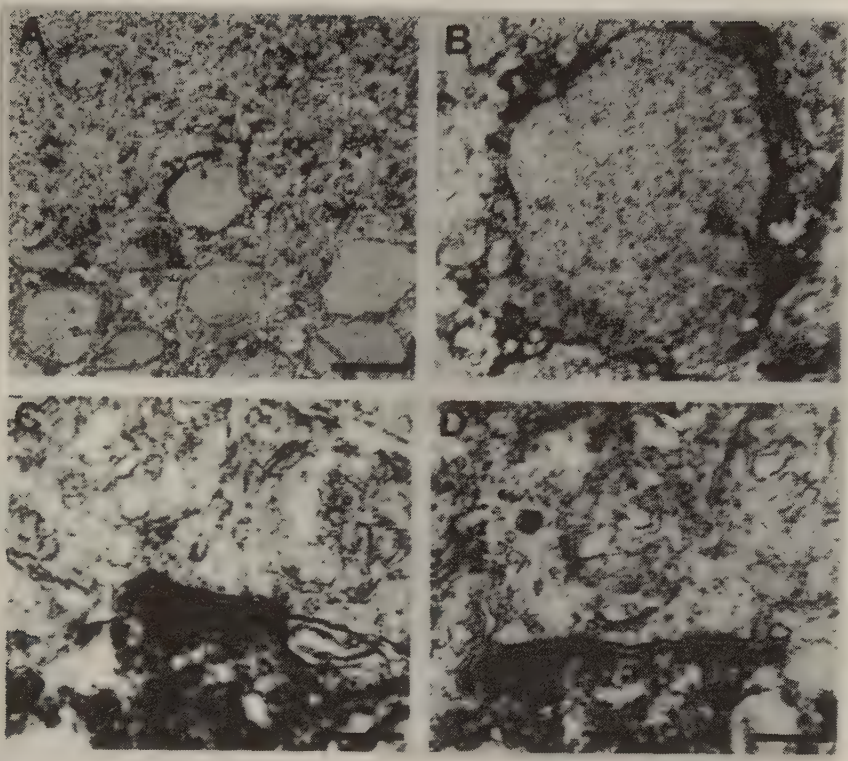

Abb.38 - Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines leicht schrägen Horizontalschnittes durch eine mit Tyrosinhydroxylase gefärbte Rattenretina. Die leicht schräge Orientierung der Schnittebene bewirkt, daß Zellen, deren Zellkörper aus der Amakrinzellschicht in die innere plexiforme Schicht hineinragen, gegen den Rest der Amakrinzellen versetzt erscheinen. In A. ist ein solcher versetzter Zellkörper zu sehen. Man erkennt deutlich, daß Tyrosinhydroxylase markierte Fortsätze den Zellkörper umgeben. B, höhere Vergrößerung einer solchen versetzten Zelle und der umliegenden markierten Dendriten. C und D zwei Beispiele dafür, daß tyrosinhydroxylase positiven Fortsätze am Soma dieser Zellen, Synapsen mit langen Kontaktzonen ausbilden. Da hauptsächlich die AII-Amakrinzellen mit ihren Zellkörpern in die innere plexiforme Schicht hereinragen, ist anzunehmen, daß es sich bei den hier gezeigten Beispielen um AII-Zellen handelt. Skala: A=7,0µm; B=1,4µm; C=0,2µm; D=0,2µm.

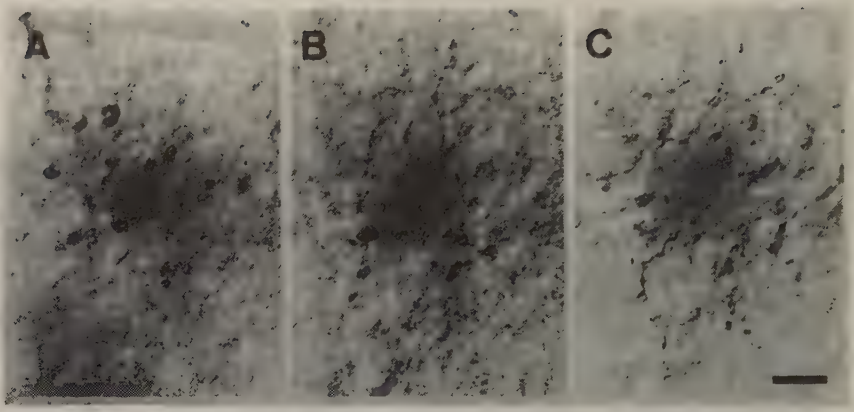

Abb.39 - Fokusserie mit Normarski-Interferenzkontrast durch eine mit Lucifer Yellow injizierte AII Amakrinzelle der Katzenretina nach der photooxidativen Umwandlung. Die Aufnahmen zeigen den Dendritenbaum in drei verschiedenen Ebenen. A. Das vorstehende Soma mit den kölbchenförmigen Fortsätzen. B. Der mittlere Teil des Dendritenbaumes. C. Der an der Grenze der Ganglienschichtzellschicht verzweigende Teil des Dendritenbaumes. Skala: 10µm.

Abb.40 - Vertikalschnitt durch eine mit Lucifer Yellow injizierte AII Amakrinzelle der Rattenretina nach der photooxidativen Umwandlung und zusätzlicher Färbung mit dem Antikörper geyen Tyrosinhydroxylase. Man erkennt deutlich die vorstehende Zellkörperposition und die kölbchenartigen Verdickungen im somanahen Teil des Dendritenbaumes. Die tyrosinhydroxylase positiven Fasern, die an der oberen Grenze der inneren plexiformen Schicht stratifizieren, ziehen um den Zellkörper herum. Links im Bild sieht man eine dopaminerge Faser zur Mitte der inneren plexiformen Schicht ziehen. Skala: 10µm.

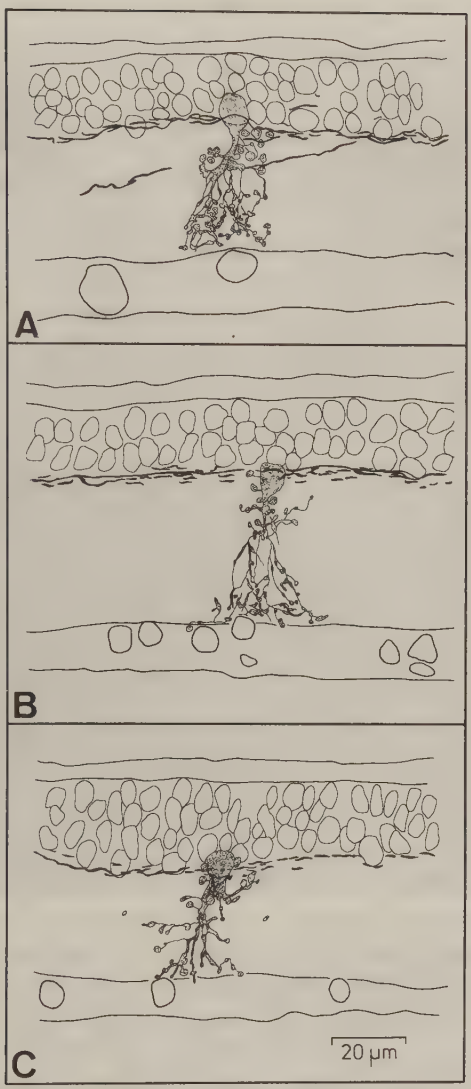

Abb.41 - Rekonstruktionen von drei Ratten AII Amakrinzellen aus Schnittserien (Schnittdicke betrug 5µm). A. Gesamtdarstellung der in Abb.40 gezeigten Zelle. Dopaminerge Fasern umringen die Zellkörper beim Durchtritt durch den Plexus.

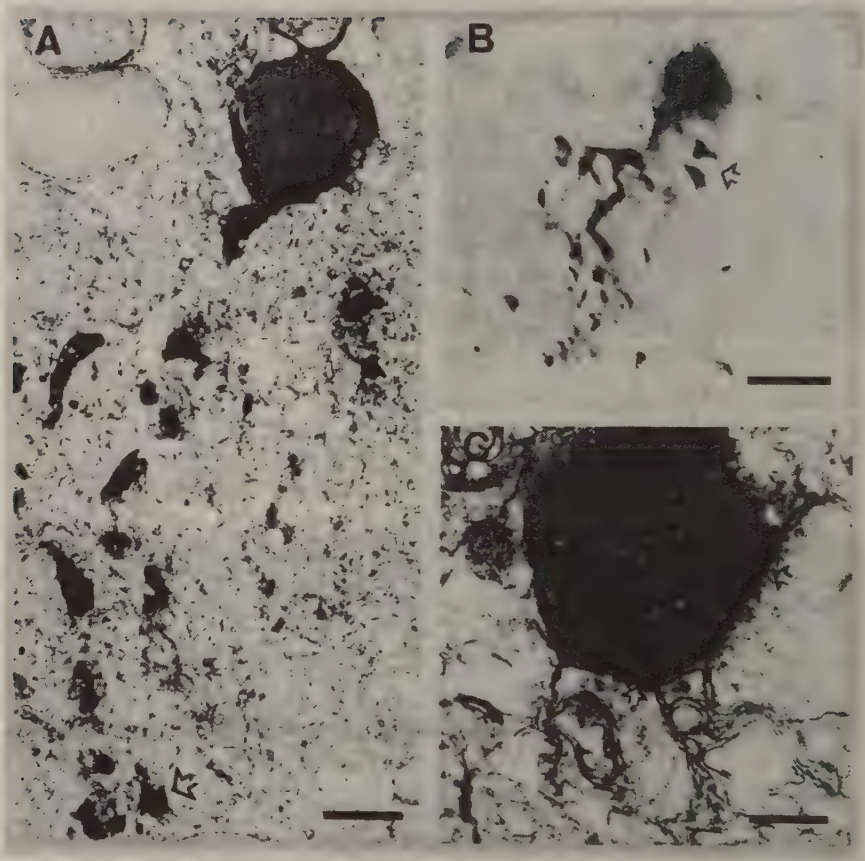

Abb.42 - A. EM-Aufnahme einer Ratten AII Amakrinzelle. B. Lichtmikroskopische Aufnahme der gleichen Zelle vor der Aufarbeitung für das Elektronenmikroskop. Der Pfeil deutet auf zwei der kölbchenförmigen Verdickungen hin, die man in der EM-Aufnahme (A) rechts sehen kann. C. Synaptische Kontakte, die diese Zelle in der Nähe der Ganglionzellschicht auf ungefärbte Profile ausbildet (Pfeile in A) sind trotz des Reaktionsproduktes in der Zelle gut zu erkennen. Skala: A=4µm; B=10µm; C=0,3µm.

Auf jedem der ungefähr fünfzig Schnitte einer Schnittserie durch den Zellkörper einer AII Amakrinzelle, findet man auf beiden Seiten des Somas ein bis zwei der dünnen dopaminergen Fasern (Abb.43A). Verfolgt man die Fasern entlang des Zellkörpers so sieht man, daß sich die dünnen Faserstücke verdicken, eng an die Zellmembran anlegen und synaptische Komplexe ausbilden (Abb.43B). Die Dicke der Varikositäten beträgt 0,7 - 1,18µm. Die dünneren noch markierten Faserteile messen 0,1 - 0,2µm.

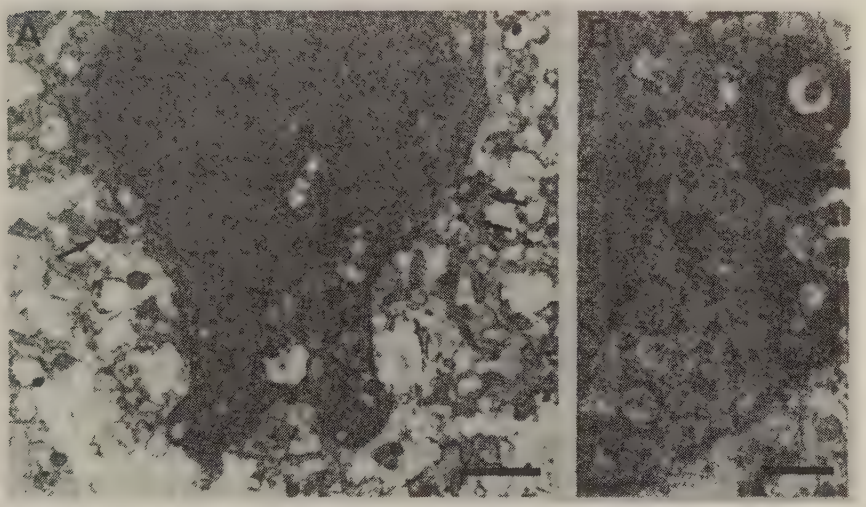

Abb.43 - A. EM-Aufnahme eines AII Amakrinzellkörpers bei der Ratte, der mit Lucifer Yellow injiziert war. Zu beiden Seiten der Zelle sieht man die Profile von tyrosinhydroxylase positiven Fasern (Pfeile). B. Einige Schnitte weiter verdicken sich diese Profile, legen sich eng an das Soma an und bilden synaptische Kontakte mit dem Zellkörper (Pfeil). Skala: A=1,5µm; B=0,7µm.

IV.4. DISKUSSION

Tyrosinhydroxylase positive Zellen in der Vertebratenretina

Bei einer immunohistochemischen Färbung mit einem Antikörper gegen das Dopamin synthetisierende Enzym Tyrosinhydroxylase färben sich bei der Katze und bei der Ratte sehr große Amakrinzellen an, die in einer, für retinale Neurone ungewöhnlich geringen Dichte auftreten (Abb.26,27). Die Fortsätze dieser Zellen verzweigen sich zu einem großen Dendritenbaum an der Grenze zwischen innerer nukleärer und innerer plexiformer Schicht (Abb.33). Bei beiden Tierarten liegen ihre langen Primärdendriten in einem dichten Faserplexus, der eine große Zahl von ringähnlichen Strukturen enthält. Diese Ringe haben den Durchmesser eines Zellkörpers (Abb.26A,B; Abb.27A), und werden aus mehreren sehr feiner Fasern gebildet (Abb.28). Wegen der Dichte des Fasernetzes können die Dendritenbäume einzelner Zellen nicht mehr unterschieden werden und man bekommt den Eindruck eines dichten einheitlichen Geflechtes (Syncytium). Trotz der guten immunohistochemischen Färbequalität, ist es nicht möglich den Ringplexus zweifelsfrei den großen Zellen zuzuschreiben. Es besteht theoretisch die Möglichkeit, das der Plexus zu einem System von zentrifugalen Fasern gehört und somit von den dopaminergen Amakrinzellen unabhängig ist. Allerdings ist dies unwahrscheinlich, denn die Färbung am blinden Fleck zeigt keinen Hinweis auf eine solch massive zentrifugale Innervierung der Retina durch dopaminerge Fasern. Deshalb ist anzunehmen, daß der Plexus aus feinen Verästellungen der dopaminergen Amakrinzellen besteht.

Vergleich zwischen dem dopaminergen System von Katze und Ratte

Trotz der auf den ersten Blick recht einheitlichen Färbung bei den beiden hier untersuchten Tierarten, gibt es manche Unterschiede. In einer gegen Tyrosinhydroxylase gefärbten Rattenretina wird die Zuordnung von Zellfortsätzen zu Zellkörpern noch schwieriger als bei der Katze. Zusätzlich zu den oben beschriebenen Elementen gibt es eine zweite Zellpopulation mit kleineren Zellkörpern. Außerdem

findet man Fasern, die aus dem Ringplexus entspringen und durch die innere nukleäre Schicht hindurch in die äußere plexiforme Schicht ziehen. Es könnte sein, daß es sich bei diesen Fasern um Fortsätze von interplexiformen Zellen handelt. Die Existenz von dopaminergen interplexiformen Zellen wurde erstmals mit der Histofluoreszensmethode bei Goldfischen und Neuweltaffen nachgewiesen (Dowling und Ehinger,'75,'78a,b; Dowling et al.,'80). In jüngerer Zeit findet man sie mit immunhistochemischen Methoden auch bei der Ratte (Nguyen-Legros,'82; Negishi,'85) (Abb.27B), allerdings ist ihre Zuordnung ungewiß. Die einzigen bei der Ratte aus Golgi-Material beschriebenen interplexiformen Zellen geben, wegen ihrer rudimentären Anfärbung, keinen Aufschluß über ihre tatsächliche Morphologie (Perry,'80). Es könnte sowohl die Gesamtheit der große Zellen sein, die neben dem Ringplexus noch die äußere plexiforme Schicht innerviert, als auch eine Unterpopulation großer Zellen, die ohne zusätzliche Methoden nicht von den ringbildenden Zellen getrennt werden kann. Für eine mögliche zweite Population spricht die im Vergleich zur Katze höhere Zelldichte bei der Ratte. Zusätzlich kommen noch die kleinen Zellen in Betracht, deren Zellkörper sich mit dem Tyrosinhydroxylase Antikörper nicht so stark anfärben lassen, als daß man sie eindeutig diesen Forsätzen zuordnen könnte.

In der Katzenretina sind interplexiforme Zellen aus Golgi-Material beschrieben worden (Boycott et al.,'75; Kolb und Famiglietti,'76; Kolb und West,'77). Da sich bei diesen Tieren durch die Histofluoreszensmethode keine Fortsätze in der äußeren plexiformen Schicht anfärben ließen, wurde allgemein angenommen, daß die interplexiformen Zellen der Katze kein Dopamin benutzen (Boycott et al.,'75). Diese Befunde decken sich mit den in dieser Arbeit gewonnen immunhistochemischen Ergebnissen. Bei den interplexiformen Zellen der Katze wird GABA als möglicher Transmitter diskutiert (Nakamura et al.,'80), wobei nicht sicher ist, ob es nur einen interplexiformen Zelltyp in der Retina gibt. Eine kürzlich erschienene Arbeit beschreibt, abweichend von den hier gemachten Beobachtungen, etwa 170 Zellen pro Katzenretina, die dem Tyrosinhydroxylase positiven großen Zelltyp entsprechen. Mit einem

Teil ihrer dicken Primärdendriten stratifizieren sie in der äußeren plexiformen Schicht (Oyster et al.,'85). Falls es sich bei diesen Zellen wirklich um interplexiforme Zellen handelt, so weichen sie mit ihren Erscheinungsbild stark von den in anderen Tierarten beobachteten Zellen ab.

Intrazelluläre Injektion von Zellkörpern nach induzierter Fluoreszenz.

Da eine immunhistochemische Färbung alle Zellen anfärbt, die das spezifische Antigen enthalten, kann man mit dieser Methode gut Zellverteilungen und Zelldichten untersuchen. Bei der Analyse der Morphologie einzelner Zellen hilft diese Technik jedoch nicht weiter. An das intrazelluläre Füllen von dopaminergen Zellen, war die Hoffnung gekoppelt, die zelluläre Grundlage der Ringe und des Dendritenplexus zu klären. Wegen ihrer geringen Dichte (Abb.36,37) kann man diese Zellen ohne eine vorherige Markierung nicht finden. Die zur Markierung verwendete Histofluoreszenzmethode bringt den Nachteil mit sich, daß die Zellmembranen durch das Glutaraldehyd poröser werden und das Lucifer Yellow dadurch schon nach kurzer Füllzeit aus dem Zellkörper austritt. Dies führt zu einer starken unspezifischen Färbung der Umgebung. Darüberhinaus lassen sich Zellen mit kleinen Faserdurchmessern generell schlechter füllen. Auch mit sehr langen Füllzeiten unter Benutzung von minimalen Stomstärken, ließ sich nur in seltenen Fällen viel mehr als der primäre Dendritenbaum der dopaminergen Zellen mit Lucifer Yellow darstellen (Abb.29,30). Man muß davon ausgehen, daß sich feine Seitenäste und die dünnen Endverzweigungen nicht füllen ließen (Abb.30). Trotzdem kommt die Rekonstruktion, bei der Lucifer Yellow gefüllte Zellen in eine Zellkörperkarte gleicher Exzentrizität eingetragen wurden, dem Bild der Immunhistochemie ziemlich nahe (Abb.32). Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die dopaminergen Zellen aus einem inneren Primärdendritenbaum bestehen, der eine Fläche von etwa 0,35mm² überdeckt, und der sich gut mit Lucifer Yellow füllen läßt. Dieser rudimentäre Dendritenbaum tritt auch mit der immunohistochemischen Färbung deutlich hervor. Die

Primärdendriten verjüngen sich an den Spitzen zu sehr feinen Fortsätzen, die vermutlich über große Distanzen reichen. Diese Dendriten bilden zusammen mit vielen feinen Verästelungen, die über die ganze Länge der Primärdendriten abzweigen, den dichten Plexus und die Ringe. Leider läßt sich dieses feine Netzwerk nur mit der immunhistochemischen Methode in seiner Gesamtheit darstellen.

Die dopaminergen Synapsen am Zellkörper der AII Amakrinzellen.

Die Frage nach der funktionellen Bedeutung der dopaminergen Ringendigungen wurde in diesem Teil der Arbeit durch eine Kombination von intrazellulärer Injektionstechnik mit Immunohistochemie untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die AII Amakrinzelle, die ein Interneuron des Stäbchensystems ist (Abb.34,39) (Kolb und Famiglietti,'74, '76; Famiglietti und Kolb,'75; Kolb,'79), mit ihrem Zellkörper in den von den dopaminergen Zellen gebildeten Ringen liegt (Abb.35). Dieser Umstand könnte trivial sein, denn bei der Dichte des dopaminergen Plexus ist es selbstverständlich, daß jedes Element, das von der inneren nukleären Schicht in die innere plexiforme Schicht zieht, durch die Verdrängung der Fasern als Loch erscheint (Abb.40,41). Das gilt sowohl für zelluläre Elemente, wie auch für Blutgefäße. Die ringähnlichen Strukturen könnten durch die simple Tatsache entstehen, daß die dopaminergen Fasern den Zellkörpern der AII Amakrinzellen ausweichen müssen. Die intensiv gefärbten Randbereiche, durch die die Ringe so deutlich hervortreten, würden sich dadurch erklären lassen, daß die großen Zellkörper viele Fasern verdrängen. Erst im Elektronenmikroskop war zu erkennen, daß diese Fasern auf den Zellkörpern der AII Amakrinzellen tatsächlich synaptische Kontakte ausbilden (Abb.43). In elektronenmikroskopischen Horizontalschnitten läßt sich besonders gut die intensive dopaminerge Innervation dieser Zellen studieren. Auf einem Schnitt kann man bis zu vier synaptische Spezialisierungen pro Zellkörper erkennen (Abb.38). Die Horizontalschnitte enthüllen darüberhinaus, daß die vertikal gesehenen, eher klein erscheinenden synaptischen Profile (Abb.43B), bei horizontaler Betrachtung erhebliche Länge aufweisen. Der Durchmesser der immunhistochemisch

markierten dopaminergen Fasern, sowie der Varikositätendurchmesser, deckt sich gut mit den Befunden einer autoradiographischen Arbeit, die auf Grund der Zellkörperposition erstmals die dopaminerge Innervation auf die AII Amakrinzelle postuliert hatte (Pourcho,'82). Die Übereinstimmung der AII Zelldichte (Vaney,'85) mit der Dichte der Ringe (Abb.37) zeigt, daß jeder dieser Ringe eine AII Amakrinzelle enthält. Die Ringgröße und deren Verteilung in der Retina spiegelt somit die Zellkörperform und die Zellkörperverteilung der AII Amakrinzelle wieder.

Mögliche Rolle der dopaminergen Innervation

Ein Vergleich der Zelldichten (dopaminerge Zelldichte: 5-14 Zellen/mm², AII Zellen: 500-5300 Zellen/m², Vaney,'85) (Abb.36,37) weißt darauf hin, daß beide Zelltypen grundlegend verschiedene Aufgaben erfüllen. Die AII Zelle ist mit einem Dendritenbaumdurchmesser von nur 18-95µm (Vaney,'85) ein lokal arbeitendes Neuron, das in einem engen Netzhautbereich die Verbindung vom Stäbchensystem zum Zapfensystem herstellt (Kolb und Famiglietti,'74; '76; Famiglietti und Kolb,'75; Kolb,'79). Im Gegensatz dazu hat die über große retinale Distanzen reichende und integrierende dopaminerge Zelle vermutlich modulatorische Aufgaben. Mit der starken ringförmigen Innervation um den AII Zellkörper, beeinflußt das dopaminerge System mit großer Wahrscheinlichkeit die Übertragungseigenschaften dieses Interneurons. Es drängt sich die Vermutung auf, daß Dopamin eine entscheidende Rolle bei der Umschaltung von Helladaptation zur Dunkeladaptation spielt.

V. LITERATURVERZEICHNISS

Baughman, R.W., and C.R. Bader (1977) Biochemical characterization and cellular localization of the cholinergic system in the chicken retina. Brain Res. 138: 469-485.

Berger, S.J., M.L. McDaniel, J.G. Carter, and O.H. Lowry (1977) Distribution of four potential transmitter amino acids in monkey retina. J.Neurochem. 28: 159-163.

Bloomfield, S.A., and J.E. Dowling (1985a) Roles of aspartate and glutamate in synaptic transmission in rabbit retina. I. Outer plexiform layer. J.Neurophysiol. 53: 699-713.

Bloomfield, S.A., and J.E. Dowling (1985b) Roles of aspartate and glutamate in synaptic transmission in rabbit retina. II.Inner plexiform layer. J.Neurophysiol. 53: 714-725.

Bloomfield, S.A., and R.F. Miller (1981) Functional stratification of On and Off pathways in the rabbit retina. Suppl. of Invest. Ophthalmol. 20:13: Abstract.

Bolz, J., T.E. Frumkes, T. Voigt, and H. Wässle (1985b) Action and localisation of gamma-aminobutyric acid in the cat retina. J. Physiol.,Lond. 362: 369-393.

Bolz, J., P. Thier, T. Voigt, and H. Wässle (1985a) Action and localisation of glycine and taurine in the cat retina. J.Physiol., Lond. 362: 395-413.

Bolz, J., H. Wässle, and P. Thier (1984) Pharmacological modulation of On and Off ganglion cells in the cat retina. Neurosci. 12: 875-885.

Boycott, B.B., J.E. Dowling, S.K. Fisher, H. Kolb, and A.M. Laties (1975) Interplexiform cells of the mammalian retina and their comparison with catecholamine-conteining retinal cells. Proc. R. Soc. Lond. B 191: 353-368.

Brecha, N. (1983) Retinal neurotransmitters: histochemical and biochemical studies. Chemical Neuroanatomy, By P.C.Emson(Ed.) Raven Press, New York : 85-129.

Brunn, A., and B. Ehinger (1972) Uptake of the putative neurotransmitter, glycine, into the rabbit retina. Invest.Ophtal. Vis.Sci. 11: 191-198.

Cleland, B.G., and W.R. Levick (1874b) Properties of rarely encountered types of ganglion cells in the cat́s retina and overall classification. J.Physiol.,Lond. 240: 457-492.

Cleland, B.G., and W.R. Levick (1974a) Brisk and sluggish concentrically organized ganglion cells in the cat́s retina. J. Physiol.,Lond. 240: 421-456.

Cleland, B.G., W.R. Levick, and H. Wässle (1975) Physiological identification of a morphological class of cat retinal ganglion cells. J.Physiol 248: 151-171.

Dowling, J.E., and B. Ehinger (1975) Synaptic organization of the amine-containing interplexiform cells of the goldfish and cebus monkey retinas. Science 188: 270-273.

Dowling, J.E., and B. Ehinger (1978a) Synaptic Organization of the dopaminergic neurons in the rabbit retina. J. Comp. Neur. 180: 203-229.

Dowling, J.E., and B. Ehinger (1978b) The interplexiform cell system I.Synapses of the dopaminergic neurons of the godfish retina. Proc. R. Soc. Lond. B 201: 7-26.

Dowling, J.E., B. Ehinger, and I. Floren (1980) Fluorscence and electron microscopical observations on the amine-accumulating neurons of the cebus monkey retina. The Journal of Comparative Neurology 192: 665-685.

Eckenstein, F., Y.A. Barde, and H. Thoenen (1981) Production of specific antibodies to choline acetyltransferase purified from pig brain. Neuroscience 6: 993-1000.

Eckenstein, F., M. Schwab, and H. Thoenen (1981) Cholineacetyltransferase: Purification and immunofluorescent localization in retina of four vertebrate species. Soc. Neurosci. : Abstr.7,309 Abstract.

Eckenstein, F., and H. Thoenen (1982) Production of specific antisera and monoclonal antibodies to choline acetyltransferase: characterization and use for identification of cholinergic neurons. EMBO J. 1: 363-368.

Ehinger, B. (1976) Biogenic monoamines as transmitters in the retina. Transmitters in the Visual Process. Oxfort: S.L.Bonting, pp. 145-163.

Ehinger, B. (1982) Neurotransmitter systems in the retina. Retina 2, No4: 305-321.

Ehinger, B., and B. Falck (1971) Autoradiography of some suspected neurotransmitter substances: GABA, glycine, glutamic acid, histamine, dopamine, and L-DOPA. Brain Res. 33: 157-172.

Famiglietti, E.V. (1983) "Starburst" amacrine cells and cholinergic neurons: Mirror-symmetric ON and OFF amacrine cells of rabbit retina. Brain Research 261: 138-144.

Famiglietti, E.V. (1985) Starburst amacrine cells: morphological constancy and systematic variation in the anisotropic field of rabbit retinal neurons. The Journal of Neuroscience 5, No2: 562-577.

Famiglietti, E.V., and H. Kolb (1975) A bistratified amacrine cell and synaptic circuitry in the inner plexiform layer of the retina. Brain Research 84: 293-300.

Famiglietti, E.V., and H. Kolb (1976) Structural basis for ON- and OFF-center responses in retinal ganglion cells. Science 194: 193-195.

Frederick, J.M., M.E. Rayborn, and J.G. Hollyfield (1984) Glycinergic neurons in the human retina. J.comp.Neurol. 227: 159-172.

Fukuda, Y. (1977) A three-group classification of rat retinal ganglion cells: histological and physiological studies. Brain Research 119: 327-344.

Horton, J.C., and H. Sherk (1984) Receptive field properties in the catś lateral geniculate nucleus in the absence of on-center retinal input. J.Neurosci. 4: 374-380.

Hughes, A. (1977) The pigmented-rat optic nerve:fibre count and fibre diameter spectrum. J.Comp.Neurol. 176: 263-268.

Hughes, A. (1981) Population magnitudes and distribution of the major modla classes of cat retinal ganglion cell as estimated from HRP filling and a systematic survey of the soma diameter spectra for classical neurons. J.Comp.Neurol 197: 303-339.

Hughes, A., and D.I. Vaney (1980) Coronate cells: displaced amacrines of the rabbit retina?. Journal of Comparative Neurology 189: 169-189.

Hughes, A., and E. Wieniawa-Narkiewicz (1980) A newly identified population of prisumptive microneurones in the cat retinal ganglion cell layer. Nature 284: 468-470.

Kleinschmidt, J., and S. Yazulla (1984) Uptake of 3H-Glycine in the outer plexiform layer of the retina of the toad, Bufo marinus. J. comp.Neurol. 230: 352-360.

Kolb, H. (1979) The inner plexiform layer in the retina of the cat: electron microscopic observations. Journal of Neurocytology 8: 295-329.

Kolb, H., and E.V. Famiglietti (1974) Rod and Cone pathways in the inner plexiform layer of cat retina. Science 186: 47-49.

Kolb, H., and E.V. Famiglietti (1976) Rod and cone pathways in the retina of the cat. Investigative Ophtalmology 15,No11: 935-946.

Kolb, H., and R.W. West (1977) Synaptic connections of the interplexiform cell in the retina of the cat. Journal of Neurocytology 6: 155-170.

Kondo, H., H. Kuramoto, B.H. Wainer, and N. Yanaihara (1985) Discrete distribution of cholinergic and vasoactive intestinal polypeptidergic amacrine cells in the rat retina. Neuroscience Letters 54: 213-218.

Leranth, C., and E. Feher (1983) Synaptology and sources of vasoactive intestinal polypeptide and substance P containing axons of the cat celiac ganglion. aAn experimental electron microscopic immunohistochemical study. Neuroscience 10: 947-958.

Levick, W.R. (1972) Another tungsten microelectrode. Med.biol.Eng. 10: 510-515.

Maranto, A.R. (1982) Neuronal mapping: A photooxidation reaction makes lucifer yellow useful for electron microscopy. Science 217, 3: 953-955.

Marc, R.E., and D.M.K. Lam (1981) Glycinergic pathways in the goldfish retina. J.Neurosci. 1: 152-165.

Marc, R.E., and W.L.S. Liu (1984) Horizontal cell synapses onto glycine-accumulating interplexiform cells. Nature 312: 266-269.

Marshall, J., and M. Voaden (1974) An investigation of cells incorporating (3H)GABA and (3H)glycine in the isolated retina of the rat. Exp.Eye Res. 18: 367-370.

Masland, R.H. (1983) Direct fluorescent labeling of amacrine cell subpopulations. Invest. Ophthal. 24: 260 Abstract.

Masland, R.H., and J.W. Mills (1979) Autoradiographic identification of acetylcholine in the rabbit retina. J. Cell Biology 83: 159-178.

Masland, R.H., J.W. Mills, and C. Cassidy (1984a) The functions of acetylcholine in the rabbit retina. Proc. R. Soc. Lon. B 223: 121-139.

Masland, R.H., J.W. Mills, and S.A. Hayden (1984b) Acetylcholine-synthesizing amacrine cells: identification and selective staining by using radioautography and fluorescent markers. Proc. R. Soc. Lond. B 223: 79-100.

Massey, S.C., D.A. Redburn, and M.L.J. Crawford (1983) The effects of 2-amino-4-phosphonobutyric acid (APB) on the ERG and ganglion cell discharge of rabbit retina. Vision Res. 23: 1607-1613.

McGuire, B.A., J.K. Stevens, and P. Sterling (1984a) Microcircuitry of bipolar cells in cat retina. The Journal of Neuroscience 4, No12: 2920-2938.

McGuire, B.A., J.K. Stevens, and SterlingP (1984b) Microcircuitry of the beta ganglion cell. The Journal of Neuroscience 4,No12: 2920-2038.

McGuire, B.A., K. Stevens, and P. Sterling (1980) Beta ganglion cells receive convergent input from 2 types of cone bipolar cells. Soc.Neurosci. 6: 347 Abstr.

Nakamura, Y., A.B. McGuire, and P. Sterling (1980) Interplexiform cell in cat retina: Identificatio by uptake of gamg-3H-aminobutyric acid and serial reconstruction. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77No.1: 658-661.

Osman, K., and R.B. Pourcho (1985) Starburst-like amacrine cells and cholinergic markers in cat retina. Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 26: ARVO abstract.

Oyster, C.W., E.S. Takahashi, M. Cilluffo, and N.C. Brecha (1985) Morphology and distribution of tyrosine hydroxylase-like immunoreactive neurons in the cat retina. Proc. Natl, Acad. Sci. 82: 6335-6339.

O'Shea, M., and C.A. Bishop (1982) Neuropeptide proctolin associated with an identified skeletal motoneuron. The Journal of Neuroscience 2,NO9: 1242-1251.

Peichl, L., and H. Wässle (1979) Size,scatter and coverage of ganglion cell receptive field centres in the cat retina. J. Physiol.,Lond. 291: 117-141.

Peichl, L., and H. Wässle (1983) The structural correlate of the receptive field centre of alpha- ganglion cells in the cat retina. J. Physiol. 341: 309-324.

Perry, V.H. (1979) The ganglion cell layer of the retina of the rat: a Golgi study. Proc. R. Soc. Lond. B 204: 363-375.

Perry, V.H. (1981) Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. Neuroscience 6, No5: 931-944.

Perry, V.H., and M. Walker (1980) Amacrine cells, displaced amacrine cells and interplexiform cells in the retina of the rat. Proc. R. Soc. Lond. B 208: 415-431.

Pourcho, R.G. (1980) Uptake of (3H)glycine and (3H)GABA by amacrine cells in the cat retina. Brain Res. 198: 333-346.

Pourcho, R.G. (1982) Dopaminergic amacrine cells in the cat retina. Brain Research 252: 101-109.

Pourcho, R.G., and D.J. Goebel (1985) A combined Golgi and autoradiographic study of (3H)glycine-accumulating amacrine cells in the cat retina. The Journal of Comparative Neurology 233: 473-480.

Puro, D.G., B.A. Battelle, and K.E. Hansmann (1982) Development of cholinergic neurons of the rat retina. Developmental Biology 91: 138-148.

Ross, C.D., D.D. Dunning, L.I. Juengel, and D.A. Godfrey (1985) Laminar distributions of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities in the inner plexiform layer of rat retina. Journal of Neurochemistry 44,No4: 1091-1099.

Schmidt, M., H. Wässle, and M. Humphrey (1985) Number and distribution of putative cholinergic neurons in the cat retina. Neuroscience Letters 59: 235-240.

Schober, W., and H. Gruschka (1977) Die Ganglienzellen der Retina der Albinoratte: Eine qualitative und quantitative Studie. Z. mikrosk.-anat.Forsch.,Leipzig 91,3: 397-414.

Sherk, H., and J.C. Horton (1984) Receptive field properties in the cat's area 17 in the absence of on-center geniculate input. J. Neurosci. 4: 381-393.

Slaughter, M.M., and R.F. Miller (1981) 2-amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retina research. Science 211: 182-185.

Slaughter, M.M., and R.F. Miller (1985) Characterization of an extended glutamate receptor of the on bipolar neuron in the vertebrate retina. J.Neurosci. 5: 224-233.

Sterling, P. (1983) Microcircuitry of the cat retina. Ann.Rev. Neurosci. 6: 149-185.

Stewart, W.W. (1978) Functional connestions between cells as revealed by dye-coupling with a highly fluorescent naphthalimide tracer. Cell 14: 741-759.

Stewart, W.W. (1981) Lucifer dyes-highly fluorescent dyes for biological tracing. Nature 292: No5818, 17-21.

Tauchi, M., and R.H. Masland (1984) The shape and arrangement of the cholinergic neurons in the rabbit retina. Proc. R. Soc. Lond. B 223: 101-119.

Tauchi, M., and R.H. Masland (1985) Local order among the dendrites of an amacrine cell population. The Journal of Neuroscience 5,No9: 2494-2501.

Tumosa, N., F. Eckenstein, and W.K. Stell (1984) Immunocytochemical localization of putative cholinergic neurons in the goldfish retina. Neuroscience Letters 48: 255-259.

Vaney, D.I. (1980) A quantitative comparison between the ganglion cell populations and axonal outflows of the visual streak and periphery of the rabbit retina. J.Comp.Neurol. 189: 215-233.

Vaney, D.I. (1984) "Coronate" amacrine cells in the rabbit retina have the "starburst" dendritic morphology. Proc. R. Soc. Lond. B 220: 501-508.

Vaney, D.I. (1985) The morphology and topographic distribution of AII amacrine cells in the cat retina. Proc. R. Soc. Lond. B 224: 475-488.

Vaney, D.I., L. Peichl, and B.B. Boycott (1981) Matching populations of amacrine cells in the inner nuclear and ganglion cell layers of the rabbit retina. J.Comp.Neurol. 199: 373-391.

Wässle, H., L. Peichl, and B.B. Boycott (1981) Morphology and topography of on- and off-alpha cells in the cat retina. Proc.R. Soc.Lond.B 212: 157-175.

Wässle, H., and H.J. Riemann (1978) The mosaic of nerve cells in the mammalian retina. Proc. R. Soc. Lond. B 200: 441-461.

Wässle, H., I. Schäfer-Trenkler, and T. Voigt (1986) Analysis of a glycinergic inhibitory pathway in the cat retina. J.Neurosc 6,No2:594-604

VI. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Wässle für seine wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit. Durch seiner Anleitung habe ich nicht nur die Methoden der Neurophysiologie und der Neuroanatomie erlernt, sondern auch viele Details, die zur Ausübung der wissenschaftlichen Tätigkeit nötig sind. Ich danke Ihm dafür, daß er mir neben seiner hilfreichen Anleitung auch viel Freiheit gelassen hat, eigene Wege zu gehen.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. L. Peichl für seine freundschaftliche Hilfe und Ratschläge. Sein kritisches Urteilsvermögen und seine wissenschaftliche Erfahrung haben mir oft geholfen und viele Entscheidungen erleichtert.

Herrn Prof. Dr. H.-U.Schnitzler möchte ich für die Begutachtung dieser Arbeit danken.

Dank auch Frau F. Boij und Frau H. Ahmed für die technische Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit.

Danken möchte ich meinen Eltern, die mir die Ausbildung ermöglicht haben, durch die diese Arbeit entstanden ist.

VII. LEBENSLAUF

7.10.1955 -Geboren in Mülheim an der Ruhr

1961 -Einschulung in die Grundschule.

1965 -nach vier Jahren Volkschule Wechsel auf das Broicher Gymnasium Mülheim-Ruhr.

1968 -Schulwechsel zum Lehrinstitut Zimmermann.

31.10.1975 -externe Abiturprüfung in Mönchengladbach durch das Schulkollegium des Regierungspräsidenten in Düsseldorf.

5.1.1976 bis 31.3.1977 -Wehrdienst als Funker im Fernmeldewesen der Luftwaffe.

18.4.1977 -Immatrikulation an der Philipp-Universität Marburg an der Lahn für das Fach Biologie mit dem Abschlußziel Diplom.

19.4.1979 -Ablegung der Vordiplomprüfung und anschließender Universitätswechsel an die Eberhard-Karls-Universität in Tübingen.

Ende 1981 -Ablegung der mündlichen Diplomprüfung in den Fächern Zoophysiologie, Pflanzenphysiologie, Biochemie und Physik (Elektronik). Anschließend Wechsel zum Max-Planck-Institut für Hirnforschung nach Frankfurt am Main.

1982 -Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Thema:"Zur Ordnung der Nervenfasern im Optischen Trakt der Katze".

1983 -Beginn der Dissertation mit dem Thema "Pharmakologische und immunhistochemische Untersuchungen an retinalen Nervenzellen".

15.5.1985 -Heirat mit der Brasilianerin Ana Dolabela de Lima.

Diese Arbeit wurde zwischen dem 1.1.1983 und dem 21.3.1986 am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt am Main unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Wässle angefertigt.

Meine akademischen Lehrer waren:
F.W.Bentrup, V.Braitenberg, H.J.Dahmen, W.Engel, W.Fischer, H.Killesreiter, C.Kirchner, I.Lenski, R.Lorenz, G.Mickoleit, W.Nultsch, F.Oberwinkler, L.Peichl, R.Remane, H.Schief, H.-U.Schnitzler, K.A.Seitz, H.Senger, D.Varjú, H.Wässle, E.Zimmermann.

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353